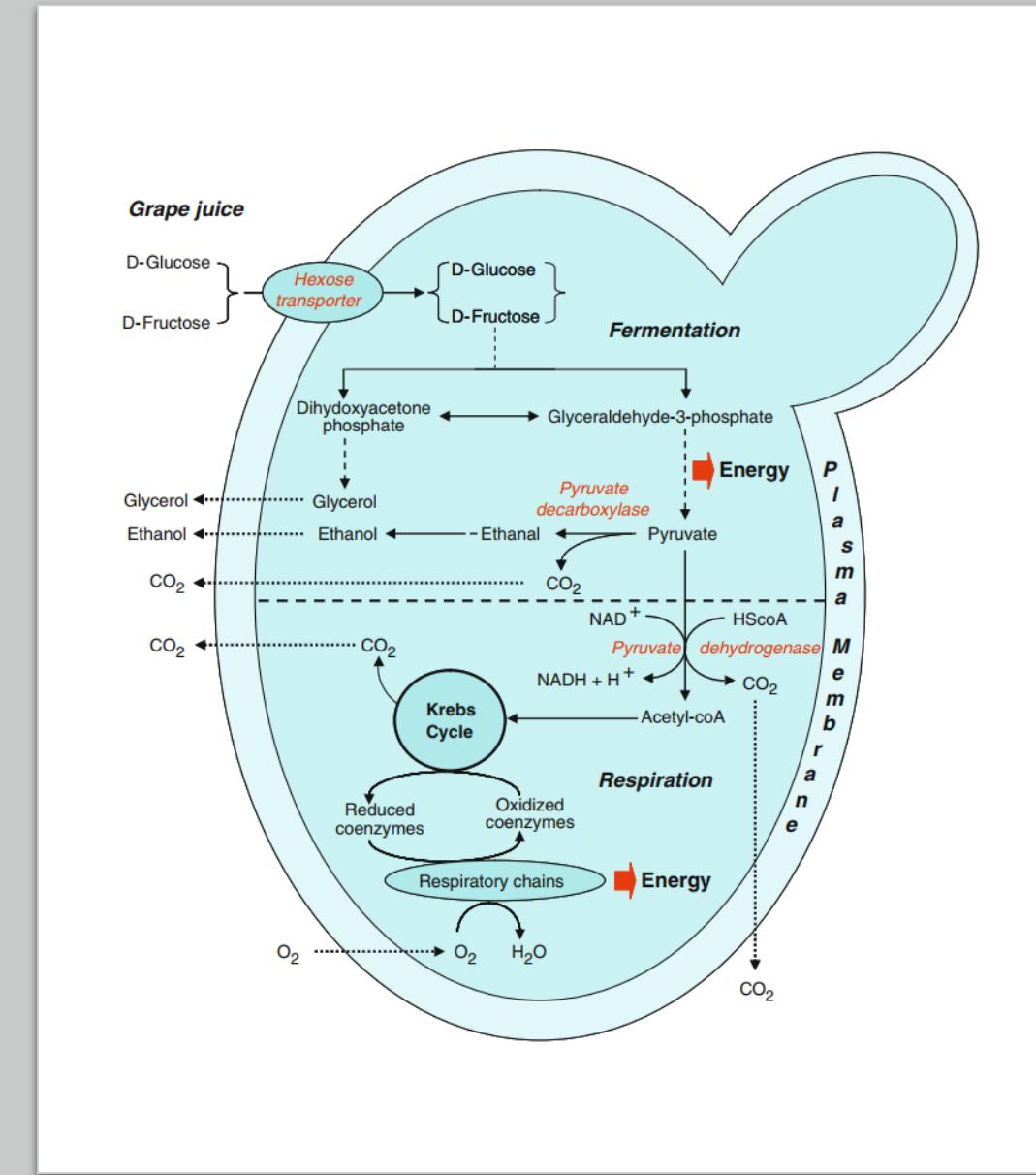


A high-magnification electron micrograph showing several yeast cells. The cells are spherical with a distinct double-membrane nucleus. Some cells are budding, and the overall texture is granular.

## Il metabolismo dei lieviti

# Le vie metaboliche della degradazione degli zuccheri

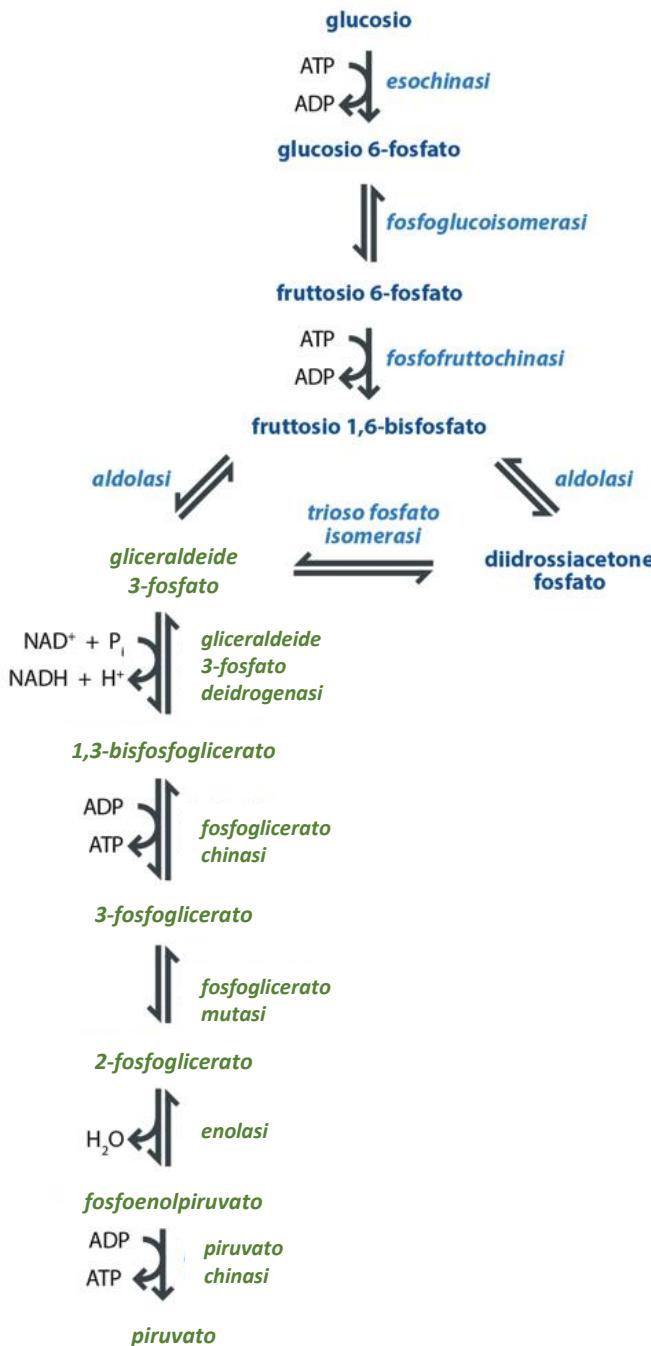
- In funzione delle condizioni di aerobiosi, i lieviti possono degradare gli zuccheri utilizzando due vie metaboliche:
- **la respirazione e la fermentazione alcolica**
- I due processi cominciano allo stesso modo con l'impiego della via comune delle glicolisi o via di Embden-Meyerhoff.



**La glicolisi** è la via centrale per il catabolismo del glucosio. La glicolisi differisce tra le diverse specie solo per dettagli della regolazione e per il destino metabolico del piruvato.

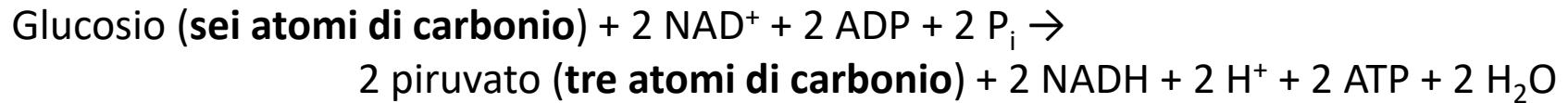
---

- Nella glicolisi una molecola di glucosio (a sei atomi di carbonio) viene degradata mediante una serie di reazioni enzimatiche, che producono due molecole di piruvato, un composto a tre atomi di carbonio.
- In tutto sono necessarie dieci reazioni catalizzate da enzimi citosolici, le prime cinque delle quali costituiscono la fase preparatoria (con dispendio di energia), mentre nelle successive cinque si ha la fase di recupero energetico (con produzione di energia).
- Tutti gli intermedi glicolitici sono fosforilati, poiché il gruppo fosforico può avere tre funzioni utili: 1) Conferisce impermeabilità alla membrana plasmatica, 2) Permette di conservare l'energia metabolica (legami ad alta energia) e 3) Riduce l'energia di attivazione ed aumenta la specificità della reazione enzimatica.



- FASE 1: Fosforilazione** del glucosio per dar glucosio-6-fosfato (l'ATP è la fonte del gruppo fosfato e l'enzima è l'esochinasi)
- $$\text{Glucosio} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glucosio-6-fosfato} + \text{ADP}$$
- FASE 2: Isomerizzazione** del glucosio-6-fosfato a fruttosio-6-fosfato. (l'enzima è la fosfoglucoisomerasi)
- $$\text{Glucosio-6-fosfato} \rightarrow \text{Fruttosio-6-fosfato}$$
- FASE 3: Fosforilazione** del Fruttosio-6-fosfato per dare Fruttosio-1,6-bisfosfato (l'ATP è la fonte del gruppo fosfato e l'enzima è la fosfofruttochinasi)
- $$\text{Fruttosio-6-fosfato} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fruttosio-1,6-bisfosfato} + \text{ADP}$$
- FASE 4: Scissione** del Fruttosio-1,6-bisfosfato in due composti a tre atomi di carbonio, la gliceraldeide-3-fosfato e il diidrossiacetone fosfato. (l'enzima è aldolasi)
- $$\text{Fruttosio-1,6-bisfosfato} \rightarrow \text{Gliceraldeide-3-fosfato} + \text{Diodrossiacetone fosfato}$$
- FASE 5: Isomerizzazione** del diidrossiacetone fosfato a gliceraldeide-3-fosfato (l'enzima è la trioso fosfato isomerasi)
- $$\text{Diodrossiacetone fosfato} \rightarrow \text{Gliceraldeide-3-fosfato}$$
- FASE 6: Ossidazione** (e fosforilazione) della gliceraldeide-3-fosfato a 1,3 bisfosfoglicerato (l'enzima è la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi)
- $$\text{Gliceraldeide-3-fosfato} + \text{NAD}^+ + \text{P}_i \rightarrow \text{NADH} + \text{1,3-bisfosfoglicerato} + \text{H}^+$$
- FASE 7: Trasferimento di un gruppo fosfato** dall' 1,3-bisfosfoglicerato all'ADP (fosforilazione di ADP a ATP) per dare il 3-fosfoglicerato. (l'enzima è la fosfoglicerato chinasi)
- $$\text{1,3-bisfosfoglicerato} + \text{ADP} \rightarrow \text{3-Fosfoglicerato} + \text{ATP}$$
- FASE 8: Isomerizzazione** del 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. (l'enzima è la fosfogliceromutasi)
- $$\text{3-Fosfoglicerato} \rightarrow \text{2-Fosfoglicerato}$$
- FASE 9: Disidratazione** del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. (l'enzima è l'enolaso)
- $$\text{2-fosfoglicerato} \rightarrow \text{Fosfoenolpiruvato} + \text{H}_2\text{O}$$
- FASE 10: Trasferimento di un gruppo fosfato** dal fosfoenolpiruvato all'ADP (fosforilazione di ADP a ATP) per dare il piruvato. (l'enzima è la piruvato chinasi)
- $$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{ATP}$$

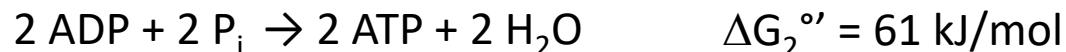
## Formazione di ATP e NADH accoppiata alla glicolisi:



- **La conversione esoergonica del glucosio in piruvato:**



- **La formazione endoergonica dell'ATP da ADP e P<sub>i</sub>:**

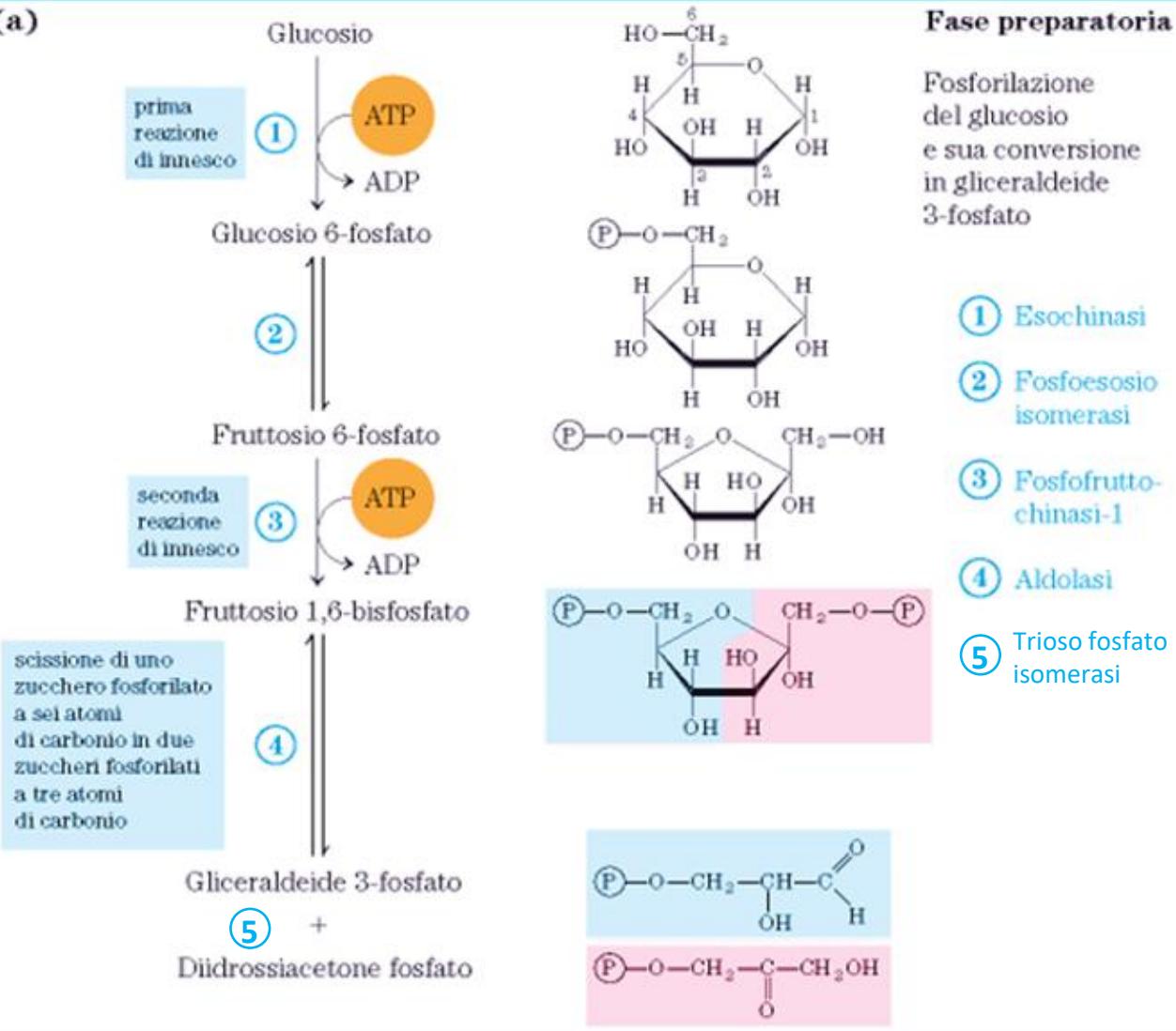


$$\begin{aligned} \Delta G^\circ &= \Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ = -146 \text{ kJ/mol} + 61 \text{ kJ/mol} \\ &= -85 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

Nella cellula la glicolisi è un processo essenzialmente irreversibile spinto da una netta diminuzione dell'energia libera

# Prima fase della glicolisi

(a)



Per ogni molecola di glucosio che percorre la fase preparatoria si formano due di gliceraldeide 3 fosfato.

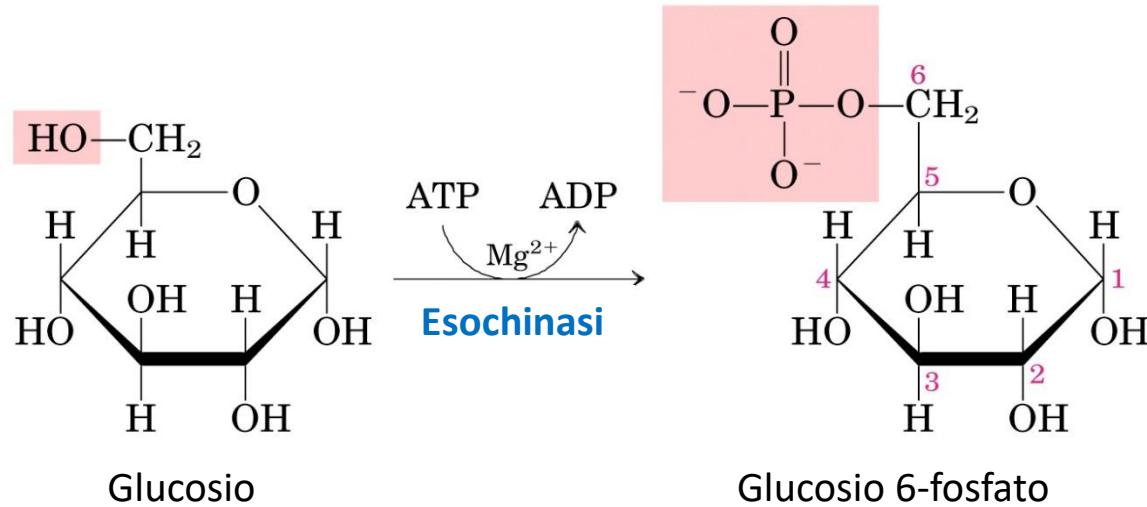
Entrambe entrano nella fase di recupero della via.

Nella prima fase vengono consumate due molecole di ATP per poter scindere la molecola di glucosio in due triosi fosfato.

## Tappa 1: Fase preparatoria

Fosforilazione del glucosio da parte dell'esochinasi: è una reazione endoergonica irreversibile.  
È un esempio dell'uso dell'energia chimica prodotta dall'ossidazione dei nutrienti e poi intrappolata nella fosforilazione del ADP ad ATP

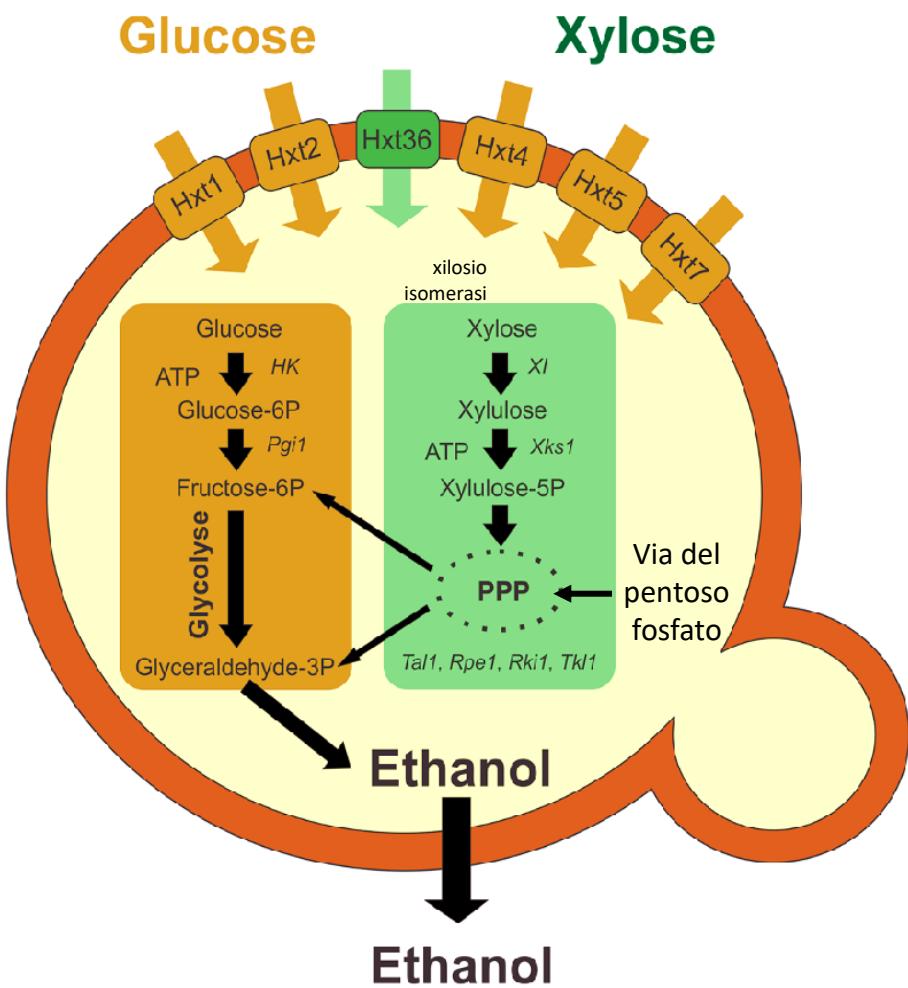
Questa reazione è  
un punto di  
controllo della via  
glicolitica



L'idrolisi dell'ATP è esoergonica



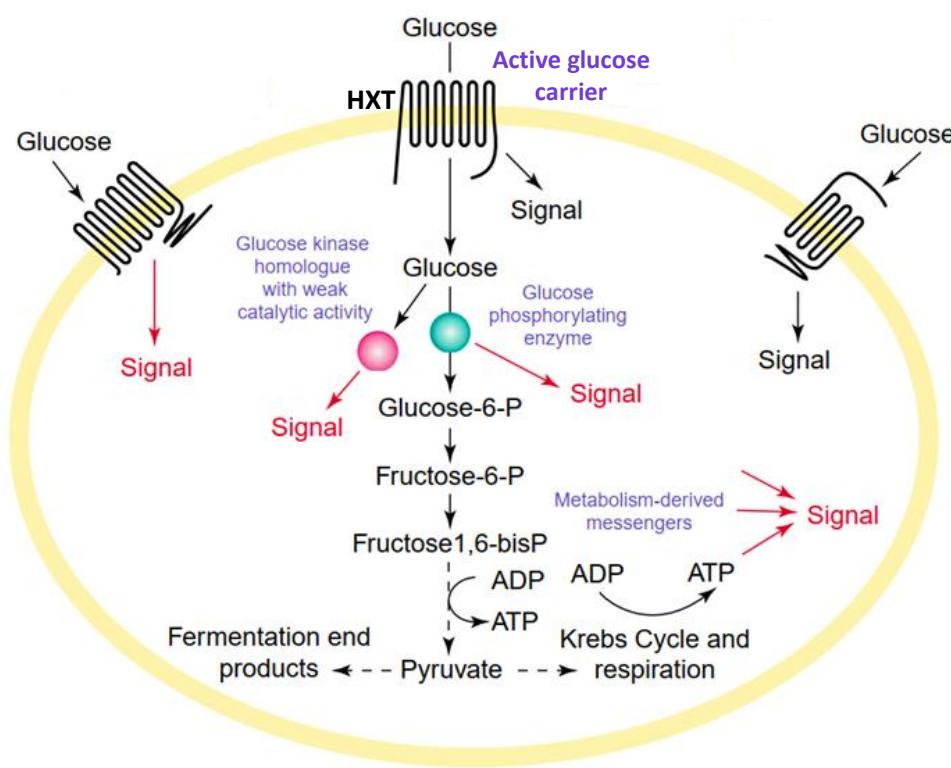
Il *Saccharomyces cerevisiae* possiede un numero diverso di trasportatori per gli zuccheri.



- Una famiglia multigenica di trasportatori per il glucosio, fruttosio e mannosio chiamati **HXT** (Hexose Transporters, **HXT1-HXT17**);
- Per il trasporto del maltosio, il **Mal11p**;
- Per il trasporto del galattosio, il **Gal2p** .

Il *Saccharomyces cerevisiae* non può fermentare naturalmente lo xilosio. Per renderlo fermentabile, è necessario introdurre geneticamente una xilosio isomerasi, che converte lo xilosio in xilulosio. Successivamente, la xilulokinasi fosforila il xilulosio a xilulosio-5-fosfato (X5P), che può entrare nella via dei pentoso fosfati e contribuire alla fermentazione.

Alcuni lieviti naturali, come *Scheffersomyces stipitis* (ex *Pichia stipitis*) e *Candida shehatae* possono metabolizzare lo xilosio e produrre etanolo.



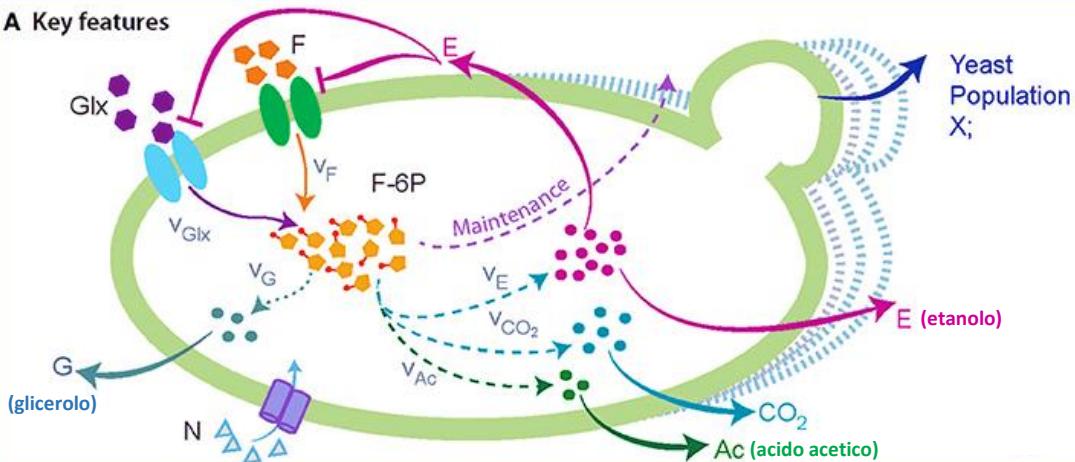
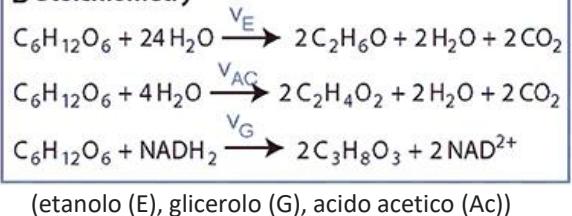
Filip Rolland et al., Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.26 No.5 May 2001

La traslocazione di una molecola di zucchero all'interno della cellula inizia con il legame e il riconoscimento dello zucchero da parte del trasportatore. Per questo, il trasportatore deve avere un meccanismo specifico di identificazione del substrato. Una volta che lo zucchero è riconosciuto e legato correttamente, il trasportatore subisce un cambiamento conformativo che permette il passaggio della molecola all'interno della cellula.

Questo processo dipende anche dalla corretta composizione lipidica della membrana, che garantisce la funzionalità del trasportatore.

Quando ci sono molti zuccheri vicini alla membrana, soprattutto glucosio e fruttosio, si crea un “affollamento molecolare” dove tante molecole competono per lo stesso trasportatore. Come conseguenze si ha la riduzione della velocità effettiva di trasporto per ogni zucchero.

Ad alta concentrazione di zuccheri, il trasportatore è sempre occupato e la velocità di trasporto non aumenta più, anche se ci sono più zuccheri disponibili.

**A Key features****B Stoichiometry**

David Henriques et al., *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* Synthetic Wine Fermentation Performance Dissected by Predictive Modeling. *Front. Microbiol.*, 02 February 2018

## Trasporto del fruttosio in *Saccharomyces cerevisiae*:

glucosio e fruttosio condividono gli stessi trasportatori, ciò significa che la loro assimilazione è competitiva. Per il glucosio è alta l'affinità (Km basso).

Per il fruttosio l'affinità è minore (Km più alto).

Quando il glucosio è presente, lega preferenzialmente i trasportatori, riducendo l'ingresso di fruttosio fenomeno chiamato repressione del glucosio.

Quando il glucosio è alto e il fruttosio è presente, i trasportatori preferiscono glucosio al fruttosio.

Quando il glucosio è basso e il fruttosio è alto, vengono espressi i trasportatori ad alta affinità per gli zuccheri alternativi (HXT6/HXT7). Quando le concentrazioni sono simili, i trasportatori legano entrambi gli zuccheri, ma il glucosio ha un'affinità superiore per i trasportatori ed entra nella cellula.

Questo fenomeno spiega perché *Saccharomyces* preferisce il glucosio, anche quando il fruttosio è disponibile.

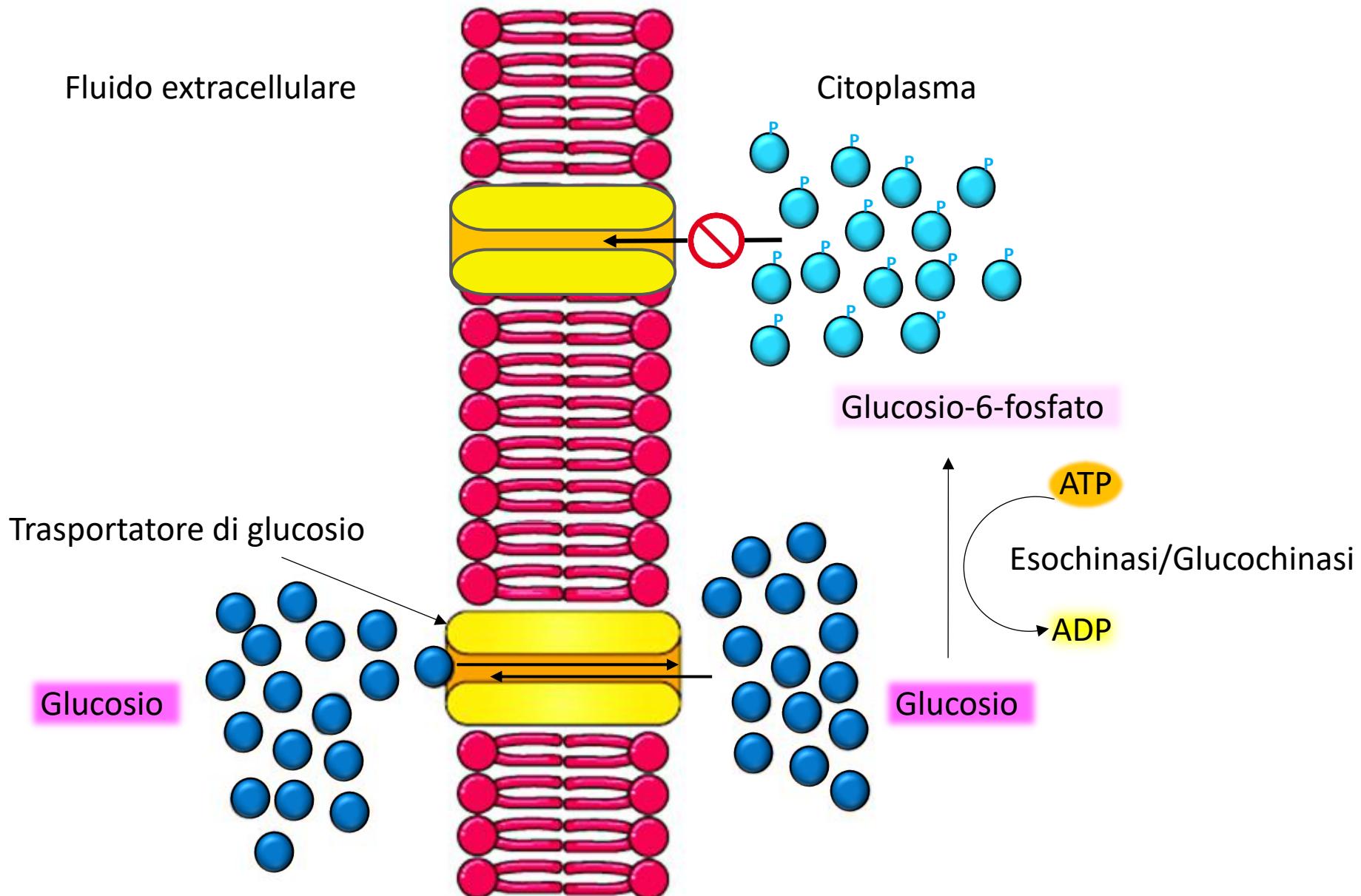
**Table 8.2** Characteristics of sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae*

Hexose transporter	Glucose affinity <sup>a</sup>	Regulation by glucose <sup>b</sup> (Laboratory strains)	Expression during fermentation <sup>c</sup> (Wine strains)
Hxt1	Low	Induced by high [glucose]	Start of fermentation
Hxt2	Moderate	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Lag phase
Hxt3	Low	Induced by high and low [glucose]	Throughout fermentation
Hxt4	Moderate	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced during growth phase
Hxt5	Moderate high	Not regulated by glucose Regulated by growth rate	Not induced
Hxt6	High	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced in stationary phase
Hxt7	High	Induced by low [glucose] Repressed by high [glucose]	Induced in stationary phase

<sup>a</sup>Reifenberger et al. (1997), Maier et al. (2002), Verwaal et al. (2002)

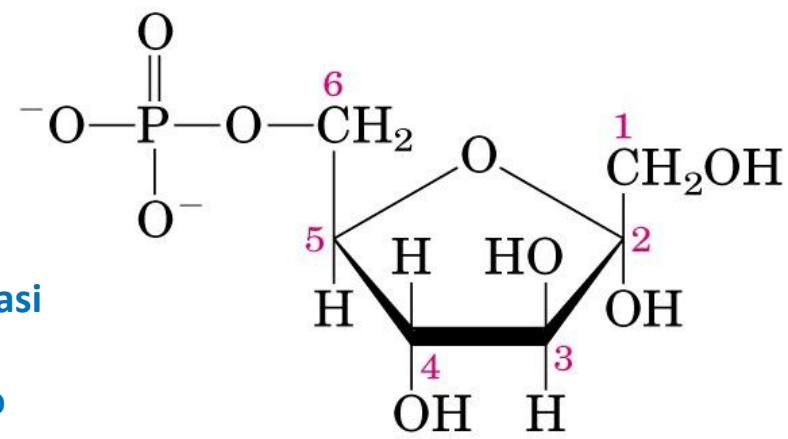
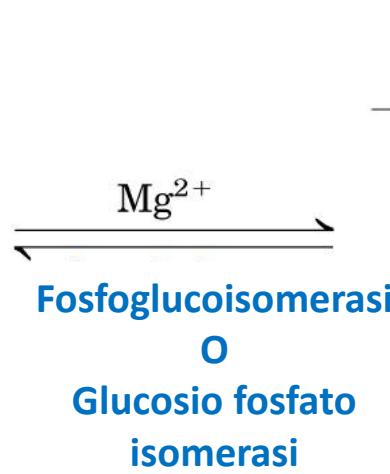
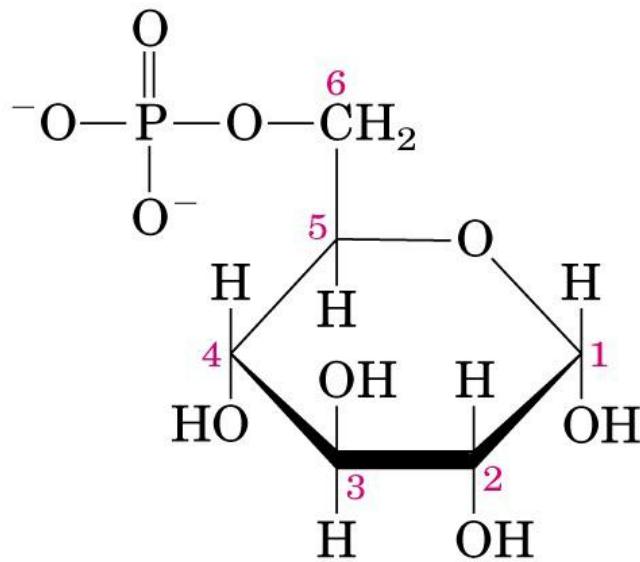
<sup>b</sup>Boles and Hollenberg (1997), Özcan and Johnston (1999)

<sup>c</sup>Luyten et al. (2002), Perez et al. (2005)

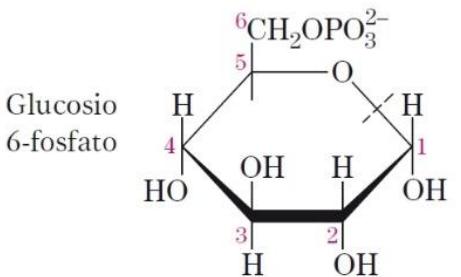


Il glucosio viene mantenuto nella cellula in seguito alla fosforilazione, non può attraversare facilmente la membrana plasmatica che sono costituite da un doppio strato lipidico idrofobico, che blocca il passaggio di molecole cariche o polari

Tappa 2: Glucosio 6-fosfato isomerizzato a fruttosio-6-fosfato  
(reazione reversibile)

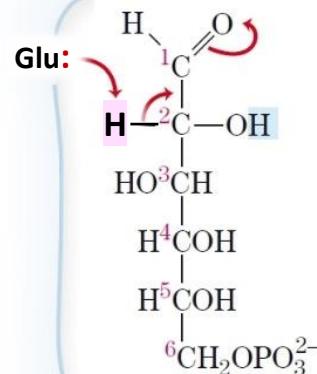


$$\Delta G'^\circ = 1.7 \text{ kJ/mol}$$



1  
Legame e  
apertura  
dell'anello

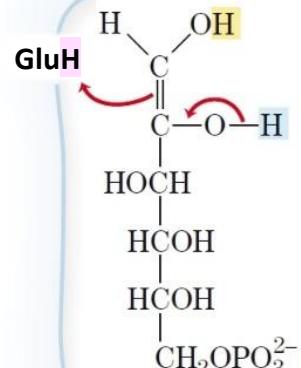
Fosfoesosio  
isomerasi



Il gruppo aldeidico C1 del glucosio 6 fosfato è ridotto a gruppo -OH ed il gruppo -OH in C2 è ossidato per dare il gruppo chetonico del fruttosio 6 fosfato. La reazione della fosfoglucoisomerasi procede attraverso la formazione di un intermedio enediolo.

2

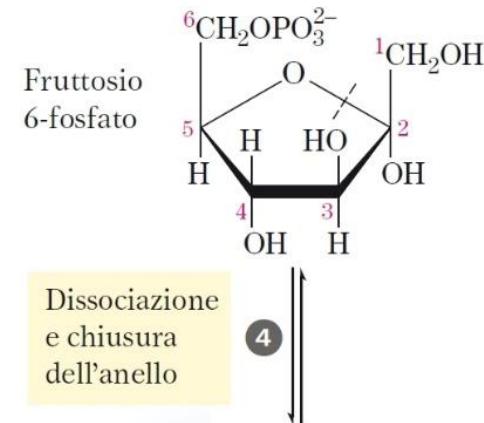
La rimozione del protone da parte del Glu (B:) del sito attivo porta alla formazione del *cis*-enediolo



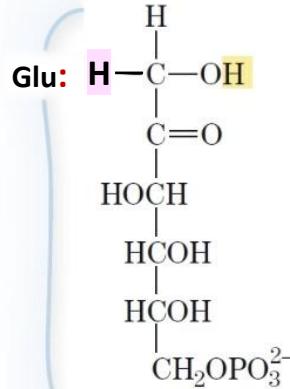
Intermedio  
*cis*-enediolo

3

La catalisi acida generale da parte dello stesso Glu facilita la formazione del fruttosio 6-fosfato



4  
Dissociazione  
e chiusura  
dell'anello

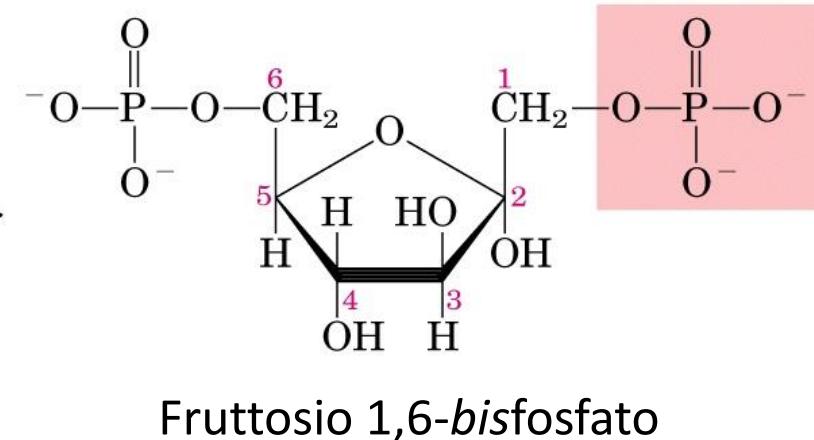
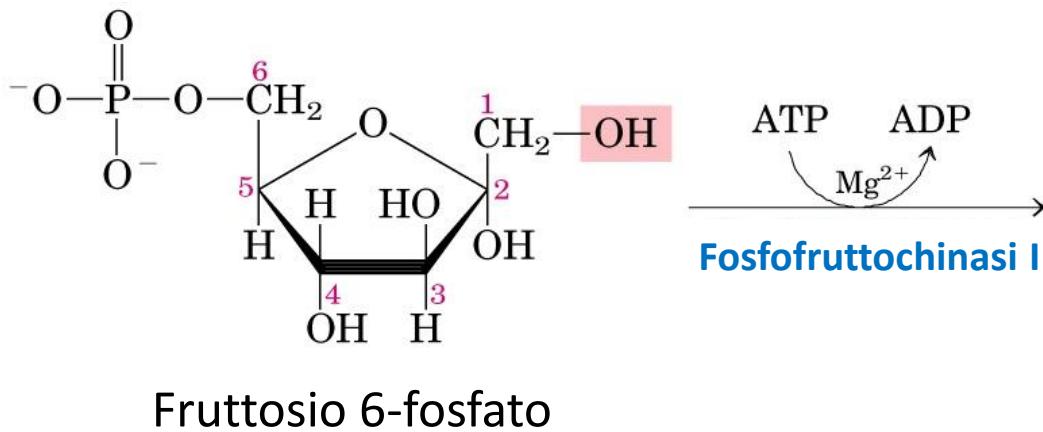


**Figura 14.5** MECCANISMO D'AZIONE La reazione catalizzata dalla fosfoesosio isomerasi. Le reazioni di apertura e chiusura dell'anello (passaggi da 1 a 4) sono catalizzate da un residuo di His posto sul sito attivo, tramite meccanismi che sono stati omessi per semplicità. Il protone (in rosa) inizialmente in C-2 è reso più facilmente rimuovibile per la vicinanza del gruppo

carbonilico adiacente e del gruppo ossidrilico. Dopo essere stato trasferito dal C-2 al Glu del sito attivo (un acido debole), il protone si scambia liberamente con la soluzione circostante; pertanto, il protone rimosso dal C-2 nella tappa 2 non è necessariamente lo stesso che viene aggiunto in C-1 nella tappa 3.

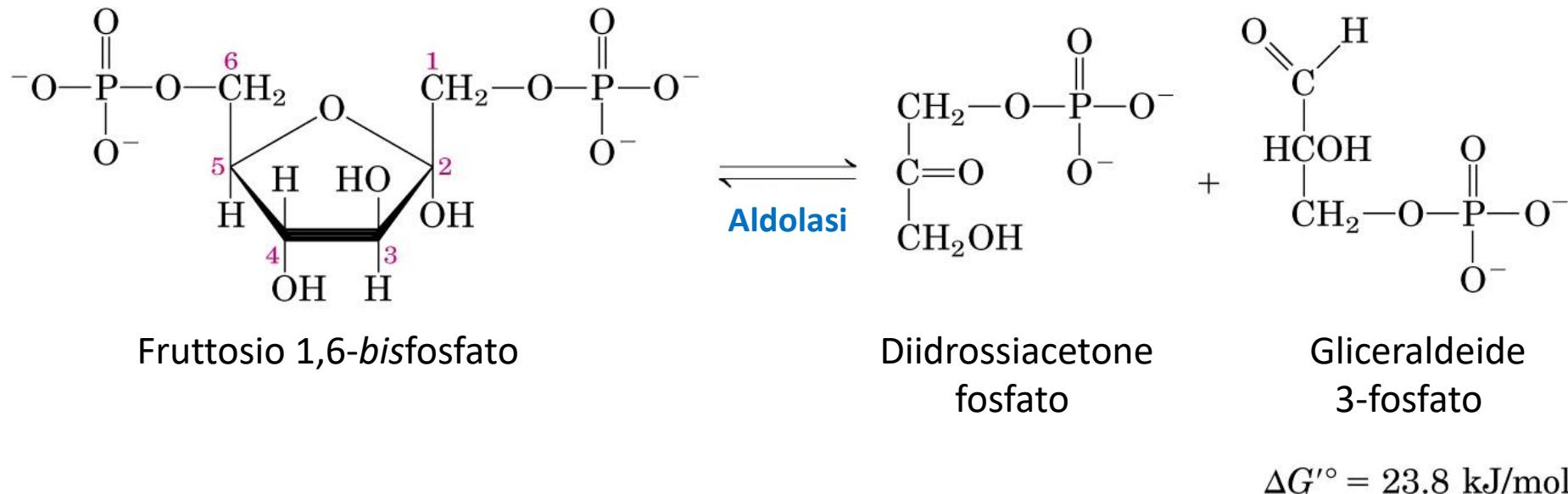
Tappa 3: Il fruttosio-6-fosfato è fosforilato per produrre fruttosio-1,6 *bisfosfato* (reazione irreversibile)

È l'enzima chiave che regola la glicolisi ed è soggetto a una complessa regolazione allosterica



$$\Delta G'{}^\circ = -14.2 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 4: il fruttosio 1,6 bisfosfato viene scisso in due composti a tre atomi di carbonio



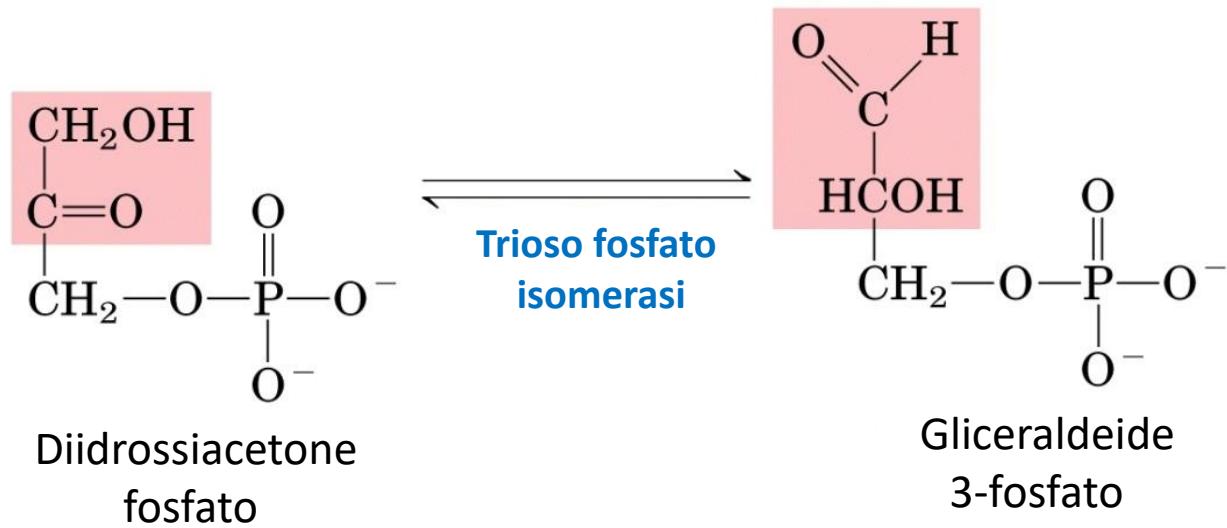
Nelle condizioni della cellula la variazione di energia libera è modesta perciò la reazione aldolasica è reversibile

L'aldolasi di tipo I è tipica degli animali e lievito il meccanismo forma un intermedio covalente «base di schiff» con il substrato,

L'aldolasi di tipo II è presente in batteri e funghi, questa contiene uno ione metallico  $Zn^{2+}$  nel sito attico.

## Tappa 5: il diidrossiacetone fosfato è convertito in gliceraldeide-3-fosfato

Dalla glicolisi vengono prodotto 2 molecole di gliceraldeide-3-fosfato: le due «metà» di glucosio sono diventate gliceraldeide 3-fosfato

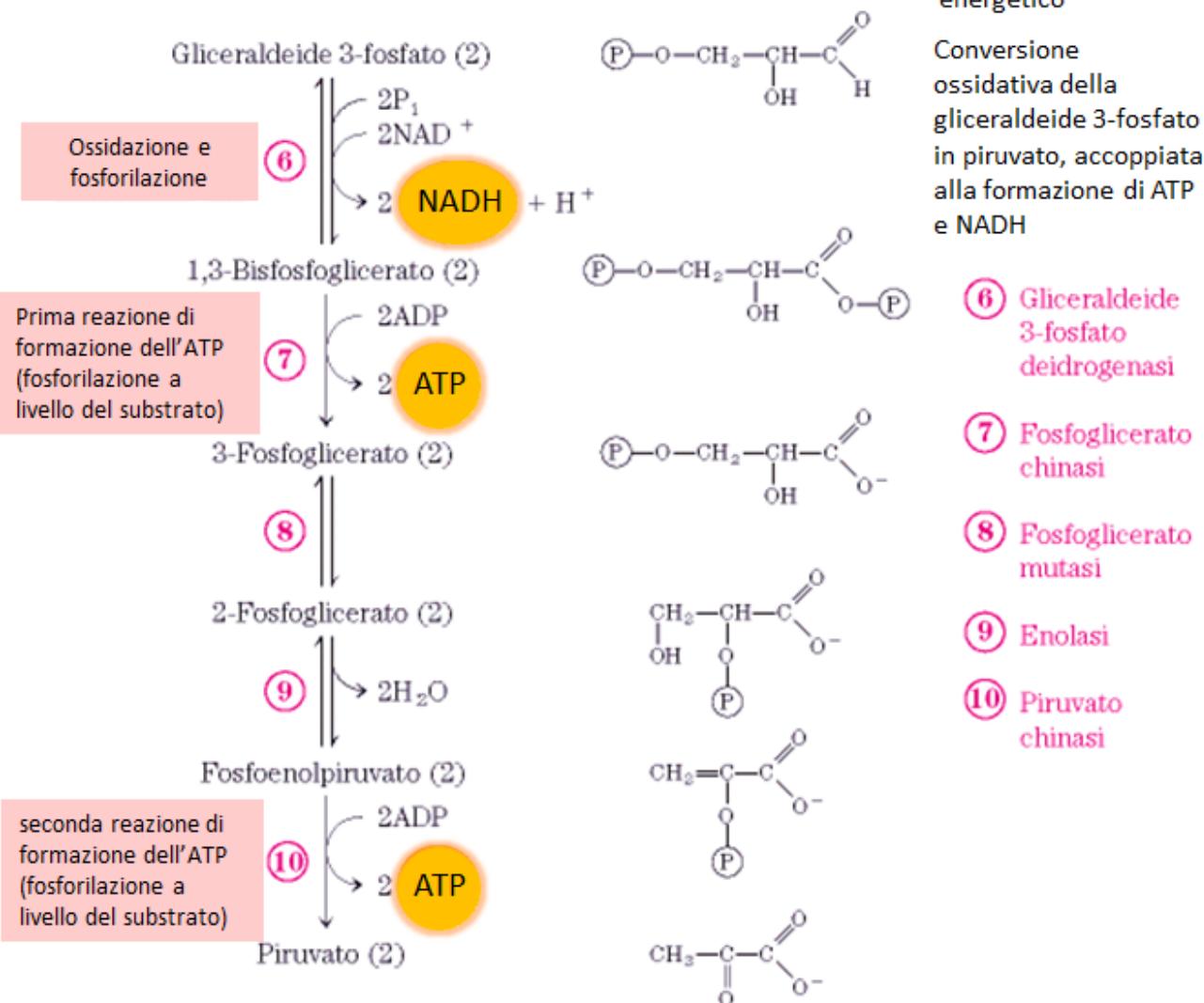


$$\Delta G'{}^\circ = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

## La reazione della Trioso fosfato isomerasi completa la prima fase della glicolisi

## Seconda fase della glicolisi

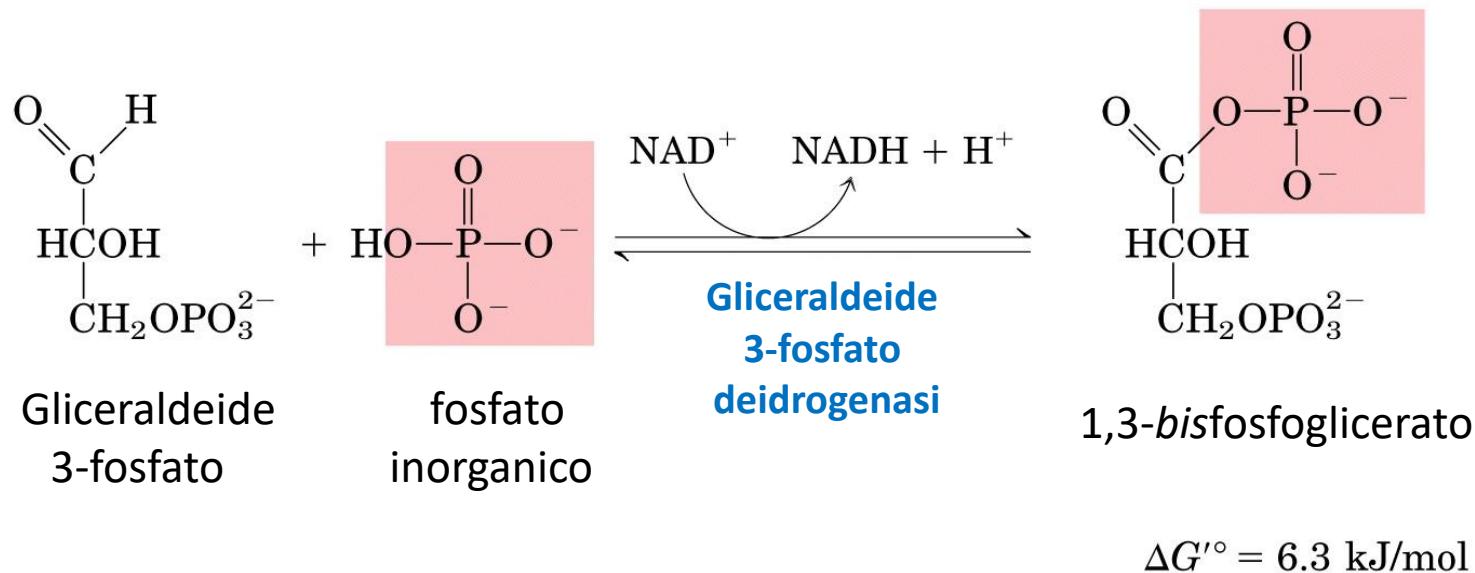
(b)



Le due molecole di gliceraldeide 3-fosfato formate entrano nella glicolisi e la formazione di due molecole di piruvato è accompagnata da 4 molecole di ATP con una resa netta di due molecole.

## FASE DI RECUPERO

Tappa 6: la gliceraldeide-3-fosfato viene ossidata a 1,3-*bis*foglicerato

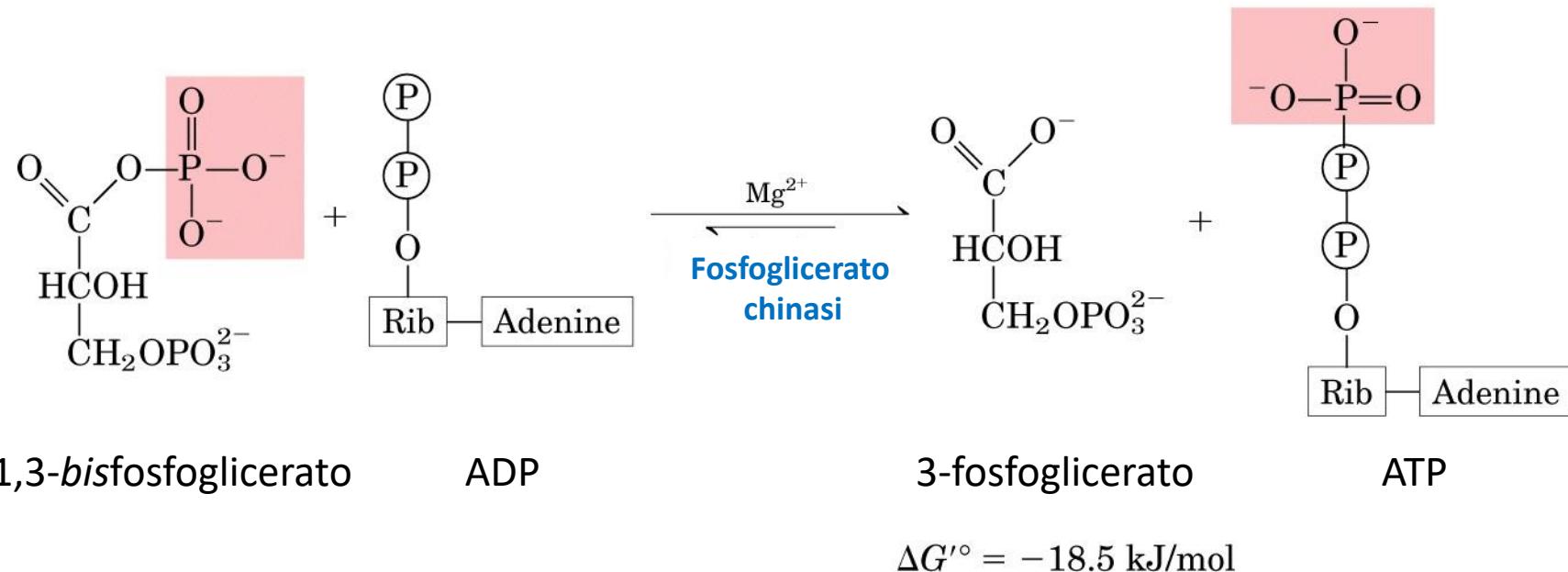


La reazione caratterizzante la glicolisi prevede l'aggiunta di un gruppo fosfato alla gliceraldeide 3 fosfato e contemporaneamente il trasferimento di elettroni dalla gliceraldeide 3 fosfato al NAD<sup>+</sup>

Il gruppo aldeidico viene ossidato invece di dar luogo a un gruppo carbossilico libero si forma un'anidride tra il gruppo carbossilico e l'acido fosforico.

L'acilfosfato ha  $\Delta G'° = -49,3 \text{ kJ/mol}$

## Tappa 7: Trasferimento di un gruppo fosfato dall' 1,3-bisfosfoglicerato all'ADP per dare il 3-fosfoglicerato

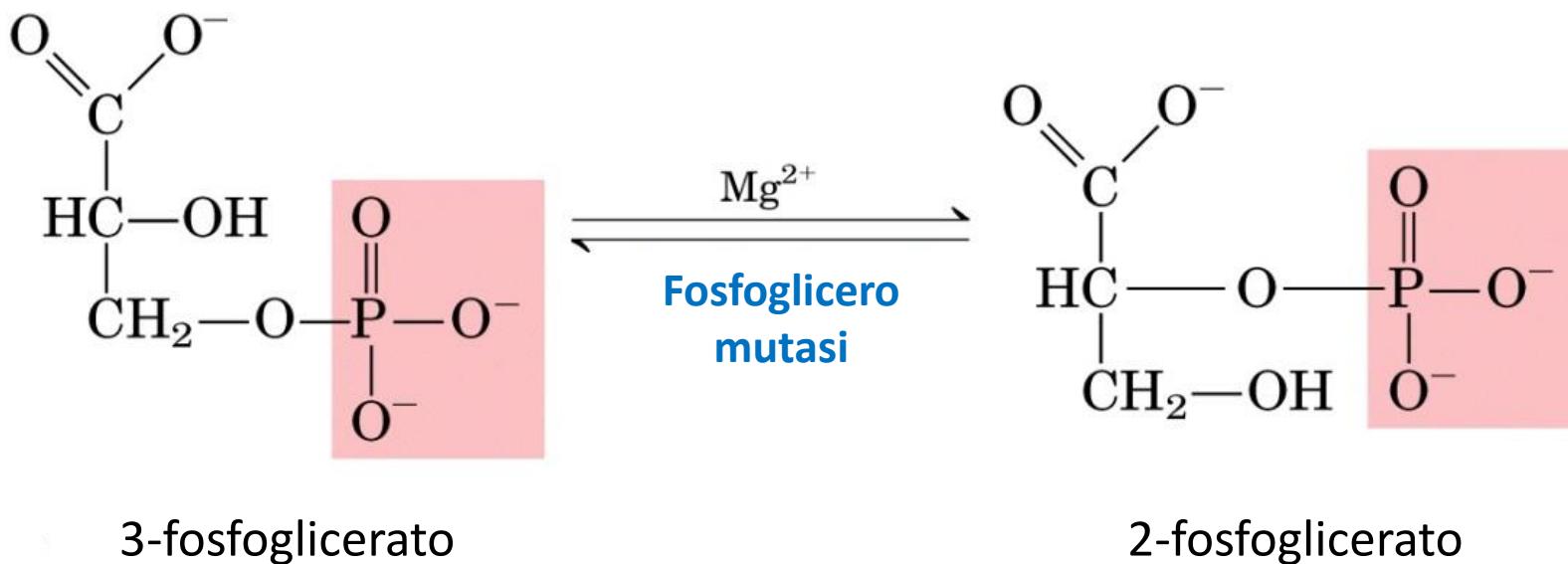


La 6° e la 7° tappa costituiscono nel loro insieme un processo di accoppiamento energetico in cui l'1,3 bisfosfoglicerato è l'intermedio comune. La reazione complessiva è esoergonica

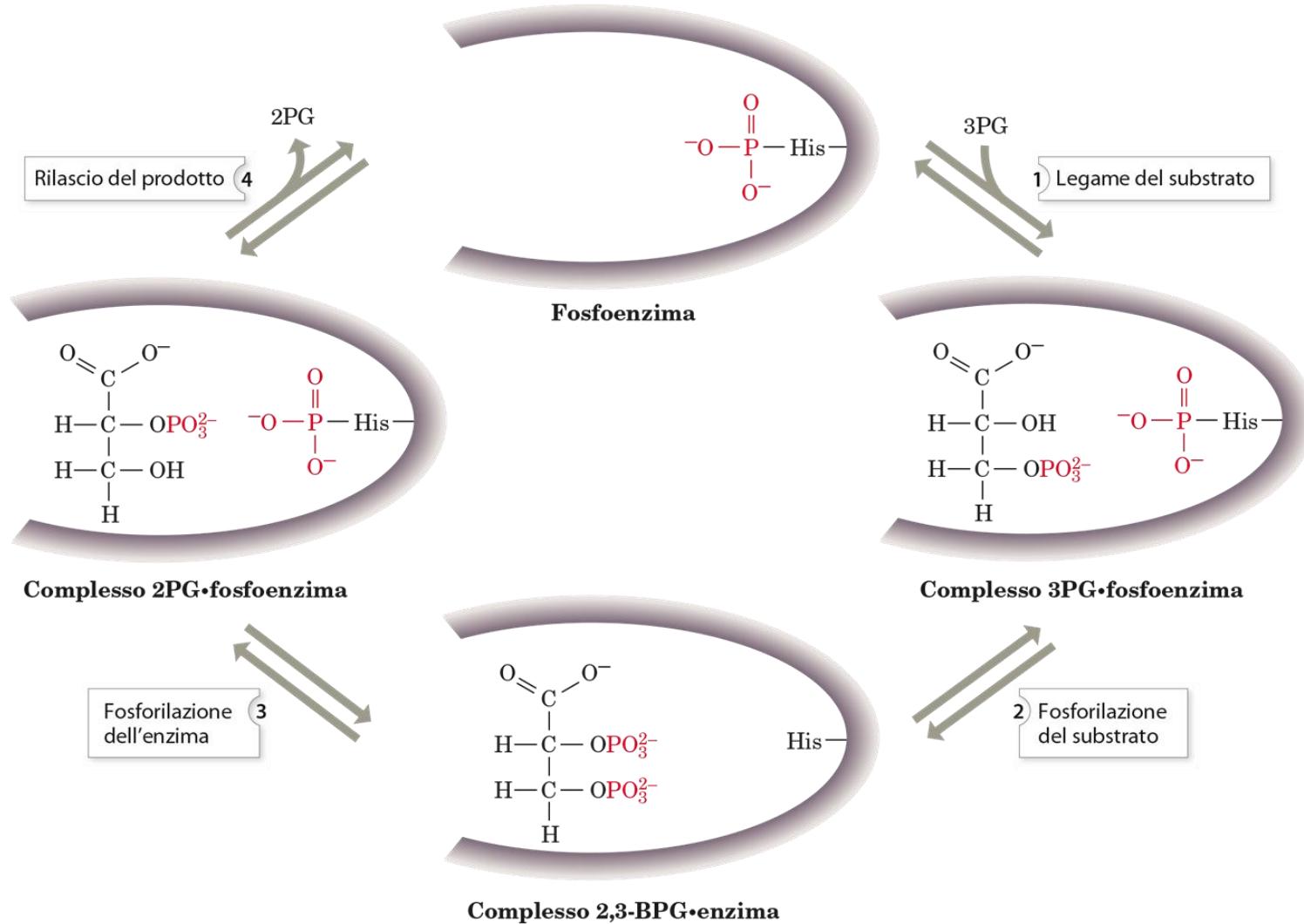
La formazione di ATP mediante il trasferimento di gruppi fosforici da un substrato come 1,3-bisfosfoglicerato viene detta:  
**FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO**  
 per distinguerla dalla fosforilazione ossidativa legata alla respirazione.

## Tappa 8 : Isomerizzazione del 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato

L'enzima che catalizza la reazione è la fosfoglicerato mutasi che catalizza lo scambio reversibile del gruppo fosforile tra il C2 e il C3 del glicerato

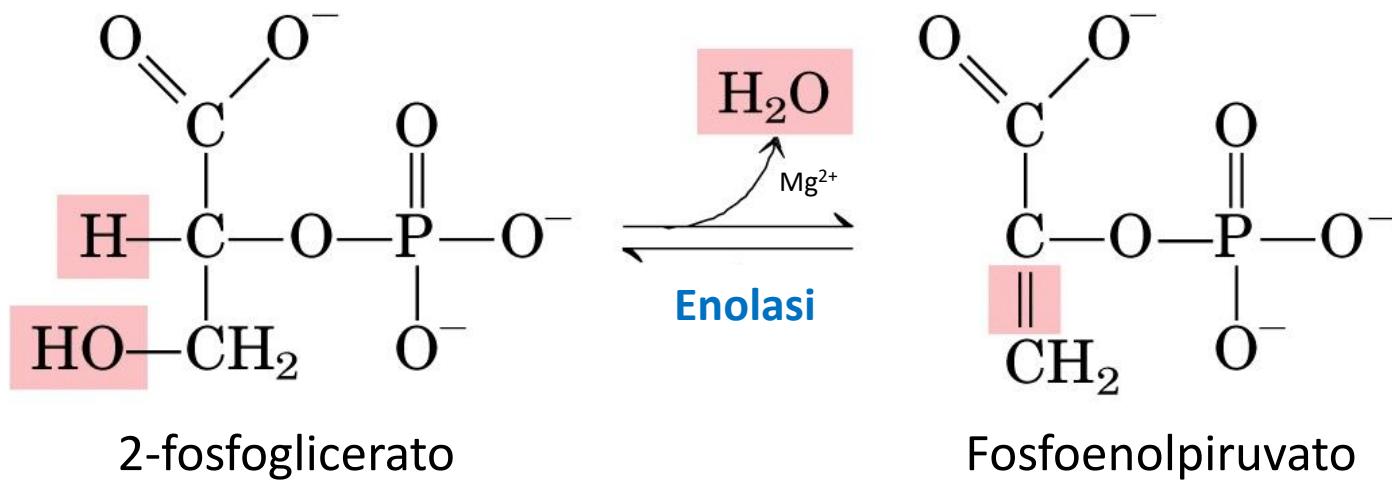


$$\Delta G'^\circ = 4.4 \text{ kJ/mol}$$



La reazione avviene in due tappe. Un gruppo fosforico inizialmente legato a un residuo di istidina della mutasi viene trasferito all'ossidrile in C2 del 3 fosfoglicerato, formando il 2,3 bifosfoglicerato. Il gruppo fosforico in C3 del 2,3 bifosfoglicerato viene trasferito allo stesso residuo di istidina. Si forma il 2 fosfoglicerato e l'enzima fosforilato viene rigenerato.

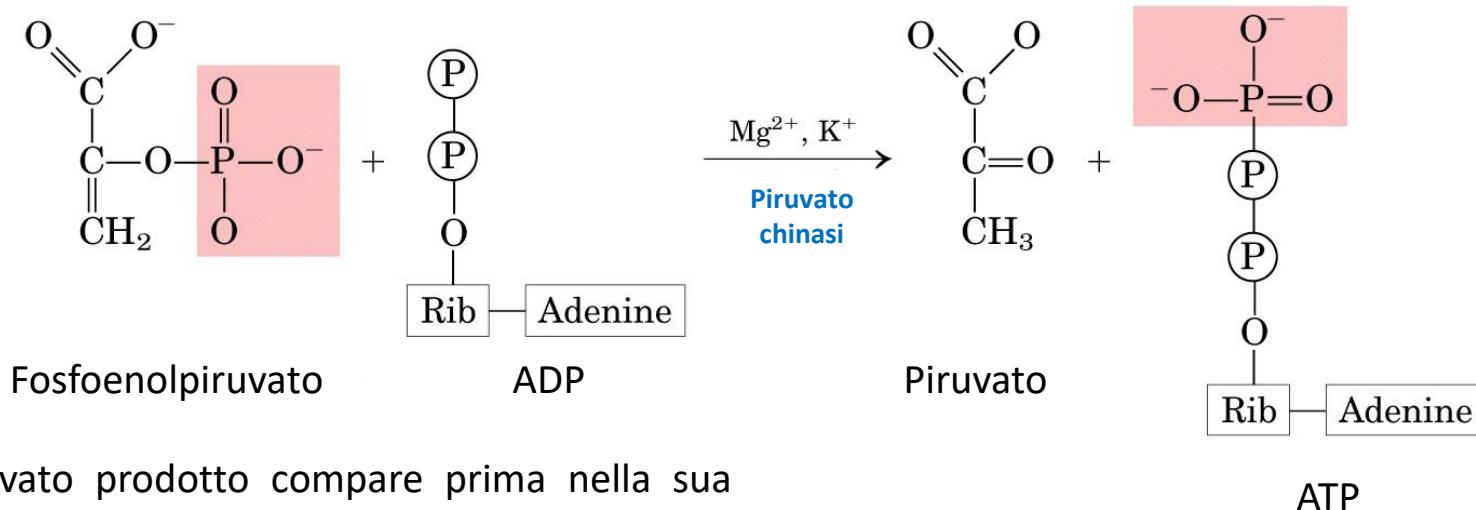
## Tappa 9: Disidratazione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato



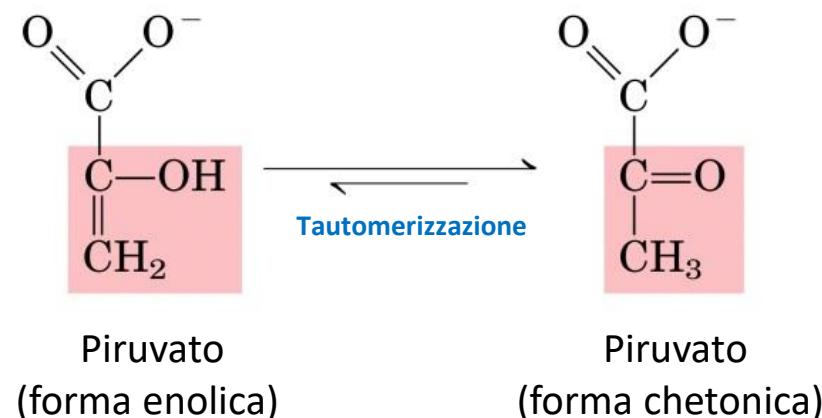
$$\Delta G'{}^\circ = 7.5 \text{ kJ/mol}$$

Tappa 10: Trasferimento di un gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato all'ADP per dare il piruvato.

### FOSFORILAZIONE A LIVELLO DEL SUBSTRATO



il piruvato prodotto compare prima nella sua forma enolica e tautomerizza rapidamente, non enzimaticamente, nella forma chetonica più stabile a pH 7,0



$$\Delta G'{}^\circ = -31.4 \text{ kJ/mol}$$

Fosfoenolpiruvato  $\rightarrow$  piruvato  
 $\Delta G'{}^\circ = -61.9 \text{ kJ/mol}$

ADP +  $\text{P}_i \rightarrow$  ATP  
 $\Delta G'{}^\circ = 30.5 \text{ kJ/mol}$

## Variazioni dell'energia libera standard nelle reazioni della glicolisi

Tappa	Reazione	Enzima	$\Delta G^\circ$ *		$\Delta G^{**}$
			kJ mol <sup>-1</sup>	kcal	kJ mol <sup>-1</sup>
1	Glucosio + ATP $\rightarrow$ Glucosio-6-fosfato + ADP	Esochinasi/Glucochinasi	-16,7	-4,0	-33,9
2	Glucosio-6-fosfato $\rightarrow$ Fruttosio-6-fosfato	Glucosio fosfato isomerasi	+1,67	+0,4	-2,92
3	Fruttosio-6-fosfato + ATP $\rightarrow$ Fruttosio-1,6-bisfosfato + ADP	Fosfofruttochinasi	-14,2	-3,4	-18,8
4	Fruttosio-1,6-bisfosfato $\rightarrow$ Diodrossiacetone fosfato + Gliceraldeide-3-fosfato	Aldolasi	+23,9	+5,7	-0,23
5	Diodrossiacetone fosfato $\rightarrow$ Gliceraldeide-3-fosfato	Trioso fosfato isomerasi	+7,56	+1,8	+2,41
6	2(Gliceraldeide-3-fosfato + NAD <sup>+</sup> + P <sub>i</sub> $\rightarrow$ 1,3-bisfosfoglicerato + NADH + H <sup>+</sup> )	Gliceraldeide-3-P deidrogenasi	2(+6,20)	2(+1,5)	2(-1,29)
7	2(1,3-bisfosfoglicerato + ADP $\rightarrow$ 3-Fosfoglicerato + ATP)	Fosfoglicerato chinasi	2(-18,8)	2(-4,5)	2(+0,1)
8	2(3-Fosfoglicerato $\rightarrow$ 2-Fosfoglicerato)	Fosfogliceromutasi	2(+4,4)	2(+1,1)	2(+0,83)
9	2(2-Fosfoglicerato $\rightarrow$ Fosfoenolpiruvato + H <sub>2</sub> O)	Enolasi	2(+1,8)	2(+0,4)	2(+1,1)
10	2(Fosfoenolpiruvato + ADP $\rightarrow$ Piruvato + ATP)	Piruvato chinasi	2(-31,4)	2(-7,5)	2(-23,0)
Globale	Glucosio + 2ADP + 2P <sub>i</sub> + NAD <sup>+</sup> $\rightarrow$ 2 Piruvato $\rightarrow$ 2ATP + NADH + H <sup>+</sup> 2(Piruvato + NADH + H <sup>+</sup> $\rightarrow$ Lattato + NAD <sup>+</sup> ) Glucosio + 2ADP + 2P <sub>i</sub> $\rightarrow$ 2 Lattato + 2ATP	Lattato deidrogenasi	-73,3 2(-25,1) -123,5	-17,5 2(-6,0) -29,5	-98,0 2(-14,8) -127,6

\* Si assume che i valori di  $\Delta G^\circ$  siano gli stessi a 25°C e a 37°C e siano calcolati in condizioni dello stato standard (concentrazioni 1 M di reagenti e prodotti a pH 7,0).

\*\* I valori di  $\Delta G$  sono calcolati a 310 K (37°C) usando le concentrazioni dello stato stazionario di questi metaboliti negli eritrociti.

# Qual è la resa energetica della glicolisi?

---

- La reazione generale della glicolisi è:
- Glucosio + 2 ATP + 2 NAD<sup>+</sup> + 4 ADP + 2P<sub>i</sub> →  
2 piruvato + 2 ADP + 2 NADH + 2 H<sup>+</sup> + 4 ATP + 2 H<sub>2</sub>O
- Cancellando i termini comuni a sinistra e destra si ottiene l'equazione della glicolisi in condizioni aerobiche:
- Glucosio + 2 NAD<sup>+</sup> + 2 ADP + 2P<sub>i</sub> →  
2 piruvato + 2 ATP + 2 NADH + 2 H<sup>+</sup> + 2 H<sub>2</sub>O

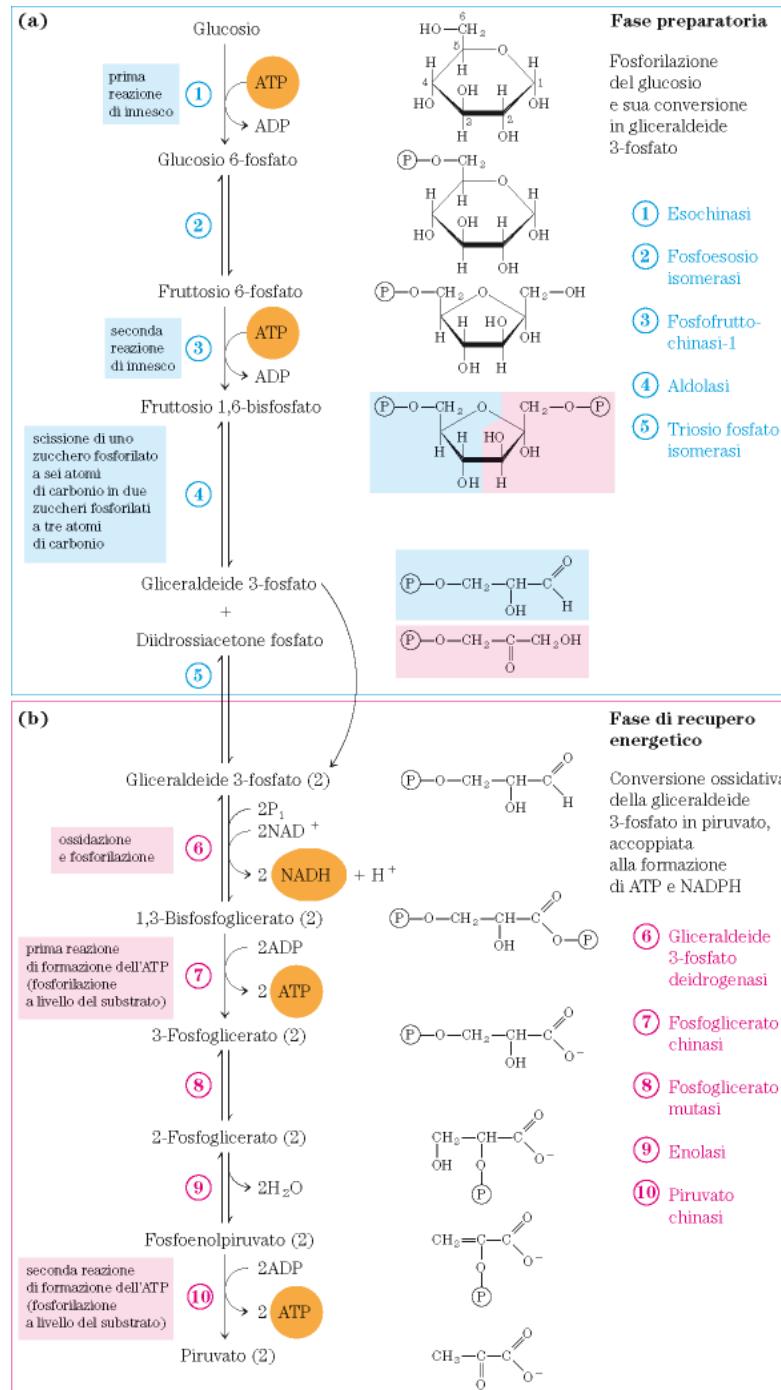
# Resa energetica nelle due fasi della glicolisi

2 ATP consumati nella fase preparatoria

2 NAD<sup>+</sup> ridotti a 2 NADH

2 P<sub>i</sub> nella reazione di formazione del 1,3 bisfosfoglicerato

4 ADP utilizzati per formare 4 ATP



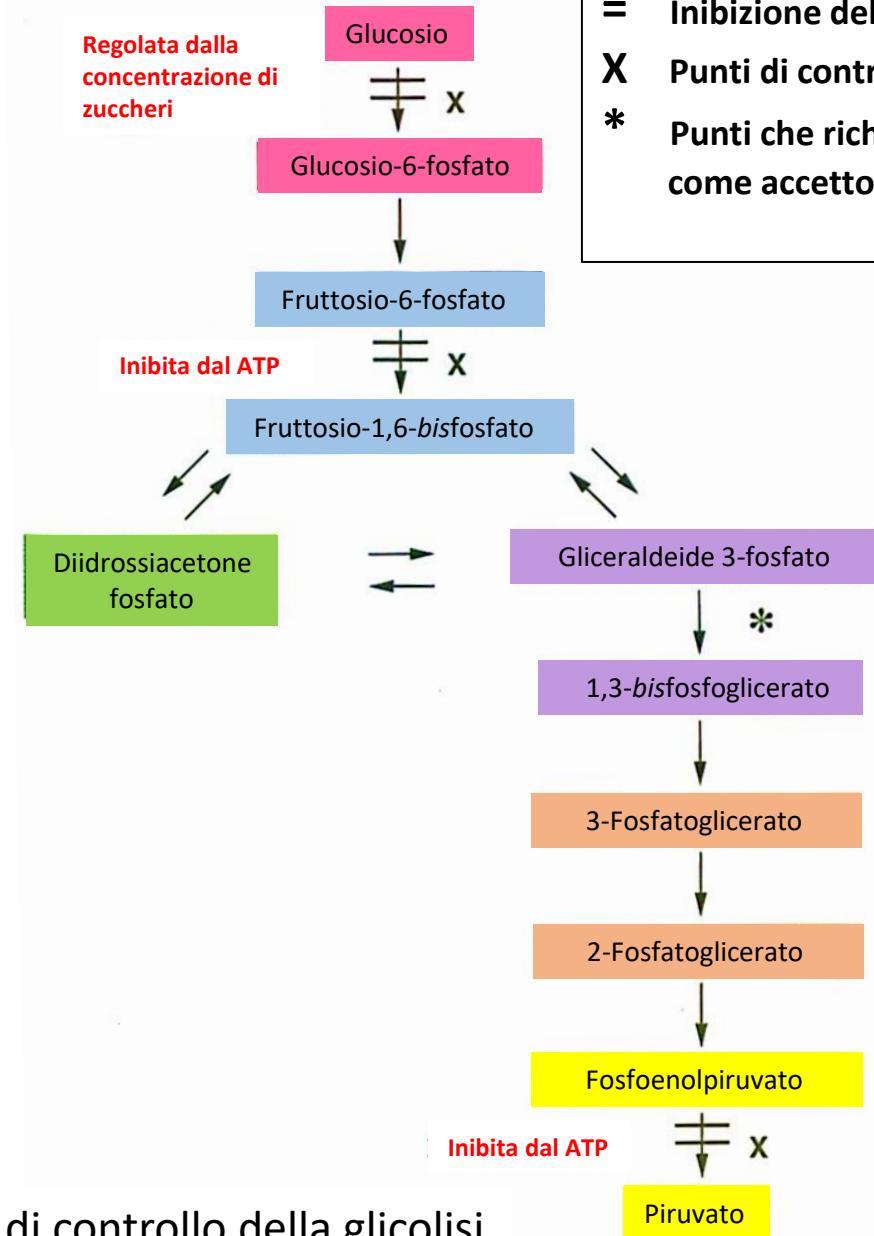
# REGOLAZIONE GLICOLISI

Il flusso del glucosio attraverso la via glicolitica deve essere regolato al fine di mantenere costanti i livelli di ATP, ma anche per rifornire la cellula di intermedi della glicolisi da utilizzare nella biosintesi.

La regolazione della velocità si basa su un equilibrato bilanciamento tra il consumo di ATP, la rigenerazione del NADH e la regolazione allosterica di alcuni enzimi della glicolisi come:

- Glucochinasi (Glk1), Esochinasi 1 (Hxk1) ed Esochinasi 2 (Hxk2): capaci di fosforilare il glucosio, il fruttosio e il mannosio.
- Fosfofruttochinasi-1
- Piruvato chinasi

Punti di controllo della glicolisi



- = Inibizione della reazione
- X Punti di controllo
- \* Punti che richiedono NAD<sup>+</sup> come accettore di elettroni

Il glucosio e il fruttosio vengono fosforilati dall'azione delle chinasi Glucochinasi (Glc1), Esochinasi 1 (Hxk1) ed Esochinasi 2 (Hxk2).

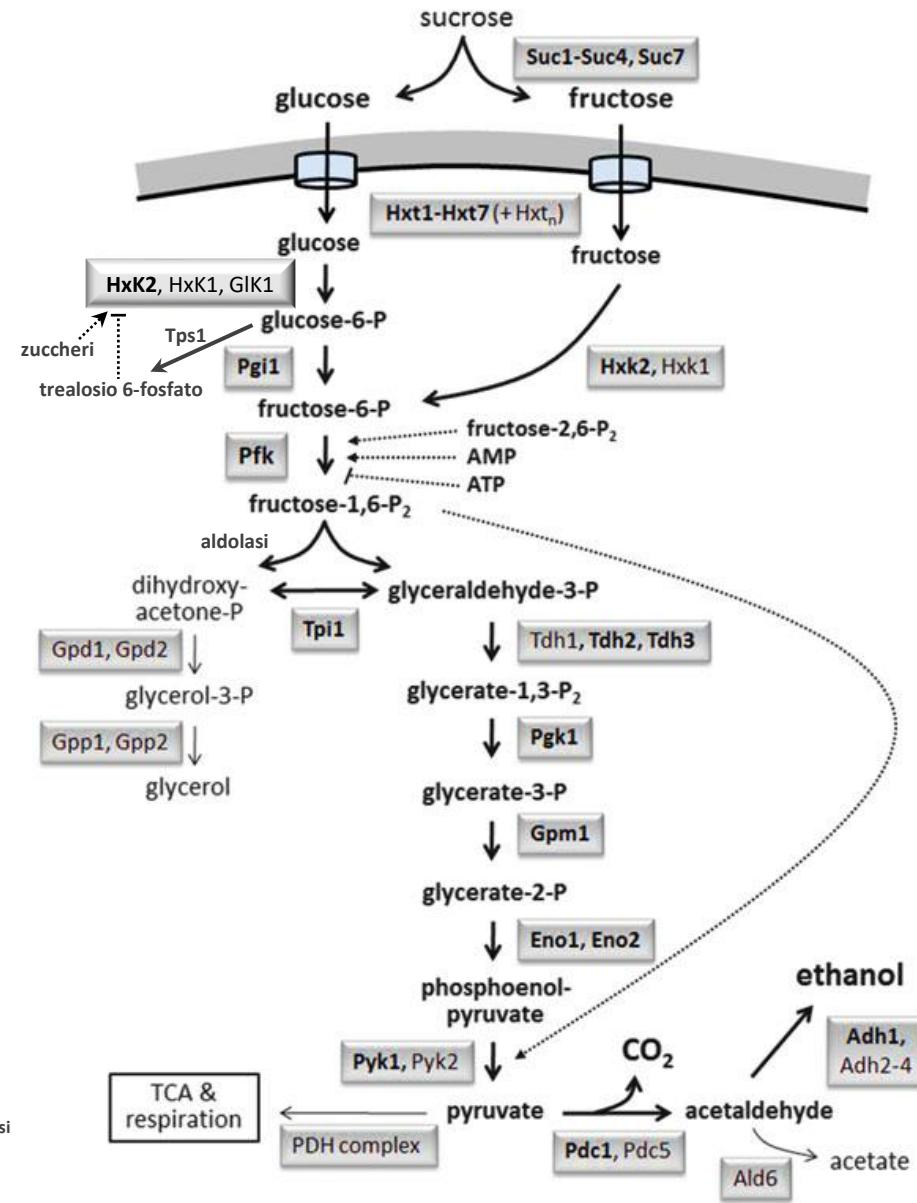
La glucochinasi utilizza glucosio o mannosio come substrati, mentre entrambe le esochinasi possono fosforilare glucosio, fruttosio o mannosio.

Studi sulla regolazione hanno dimostrato che Hxk2 è l'isoforma predominante nelle cellule in crescita e in presenza di glucosio e fruttosio.

La Hxk2 è principalmente regolata dalla concentrazione di zuccheri (nel mosto), invece, un potente inibitore allosterico della Hxk2 è il trehalosio-6-fosfato, spiegando perché una carenza di trehalosio-6-fosfato sintasi (Tps1) provoca l'inibizione della crescita.

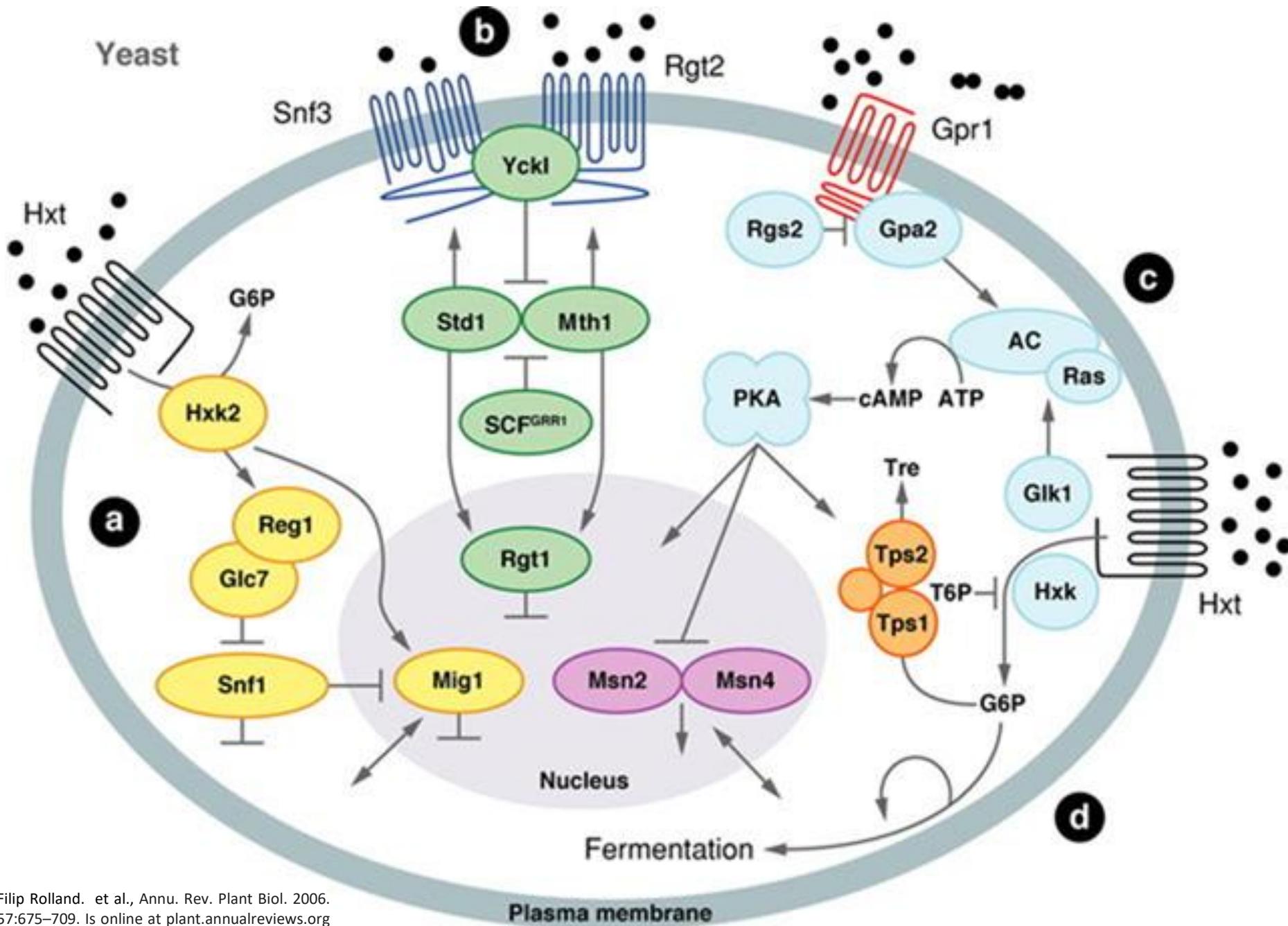
**Pgi:** fosfoglucoisomerasi  
**Pfk:** fosfofruttochinasi  
**Tpi:** trioso fosfato isomerasi  
**Gpd:** glicerolo 3-fosfato deidrogenasi  
**Gpp:** glicerolo 3-fosfato fosfatasi  
**Tdh:** gliceraleide 3 fosfato deidrogenasi  
**Pgk:** fosfoglicerchinasi  
**Gpm:** fosfogliceromutasi  
**Eno:** enolasi  
**Pyk:** piruvato chinasi  
**PDH:** complesso della piruvato deidrogenasi  
**Ald:** aldeide deidrogenasi  
**Adh:** alcol deidrogenasi

## Glicolisi nel lievito



# Il glucosio ha due effetti principali sull'espressione genica nel *S. cerevisiae*

- Reprime l'espressione di molti geni, inclusi quelli che codificano per proteine della via respiratoria (ad esempio, i citocromi) ed enzimi per l'utilizzo di fonti alternative di carbonio (ad esempio, galattosio, saccarosio e maltosio);
- Induce l'espressione di geni necessari per l'utilizzo del glucosio, inclusi i geni che codificano per enzimi glicolitici e trasportatori del glucosio.



## Qual è il ruolo dell'enzima Hxk2 durante la glicolisi?

### a) Hxk2 (esochinasi 2) è un enzima bifunzionale:

- Ha attività enzimatica: catalizza la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato, la prima reazione della glicolisi.



- Ha attività di regolazione: funge da sensore del glucosio e collega la disponibilità di glucosio con la repressione trascrizionale dei geni implicati nell'utilizzo di altre fonti di carbonio.

### Meccanismo di regolazione (via Hxk2–Mig1–Snf1)

#### In presenza di glucosio (alta concentrazione)

- L'enzima Hxk2 è attivo (fosforila il glucosio) e la glicolisi procede.
- Contemporaneamente, una parte della proteina Hxk2 entra nel nucleo e si associa con il fattore di trascrizione del gene **Mig1**.
- Il complesso **Mig1–Hxk2** si lega ai promotori di geni come **SUC2**, **GAL1**, **MAL**, ecc. (geni per il metabolismo di zuccheri alternativi) e reprime la loro trascrizione.

Nel *Saccharomyces cerevisiae*, il gene **Mig1** svolge un ruolo chiave nella repressione da glucosio. Quando il glucosio è disponibile, **Mig1** inibisce la trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo di altre fonti di carbonio, assicurando che la cellula utilizzi il glucosio come fonte energetica. In questo modo, il lievito evita di attivare vie metaboliche alternative non necessarie.

## Meccanismo di regolazione (via Hxk2–Mig1–Snf1)

### In assenza o a bassa concentrazione di glucosio:

La proteina chinasi Snf1 viene attivata.

Snf1 fosforila il fattore di trascrizione Mig1, determinandone la traslocazione dal nucleo al citoplasma.

Di conseguenza, Hxk2 non può più formare il complesso repressore Mig1–Hxk2, e i geni coinvolti nel metabolismo di fonti di carbonio alternative vengono derepressi, cioè attivati. Nel citoplasma, l'enzima Hxk2 continua a svolgere la sua funzione glicolitica, ma in queste condizioni non partecipa più alla regolazione trascrizionale dei geni sensibili al glucosio.

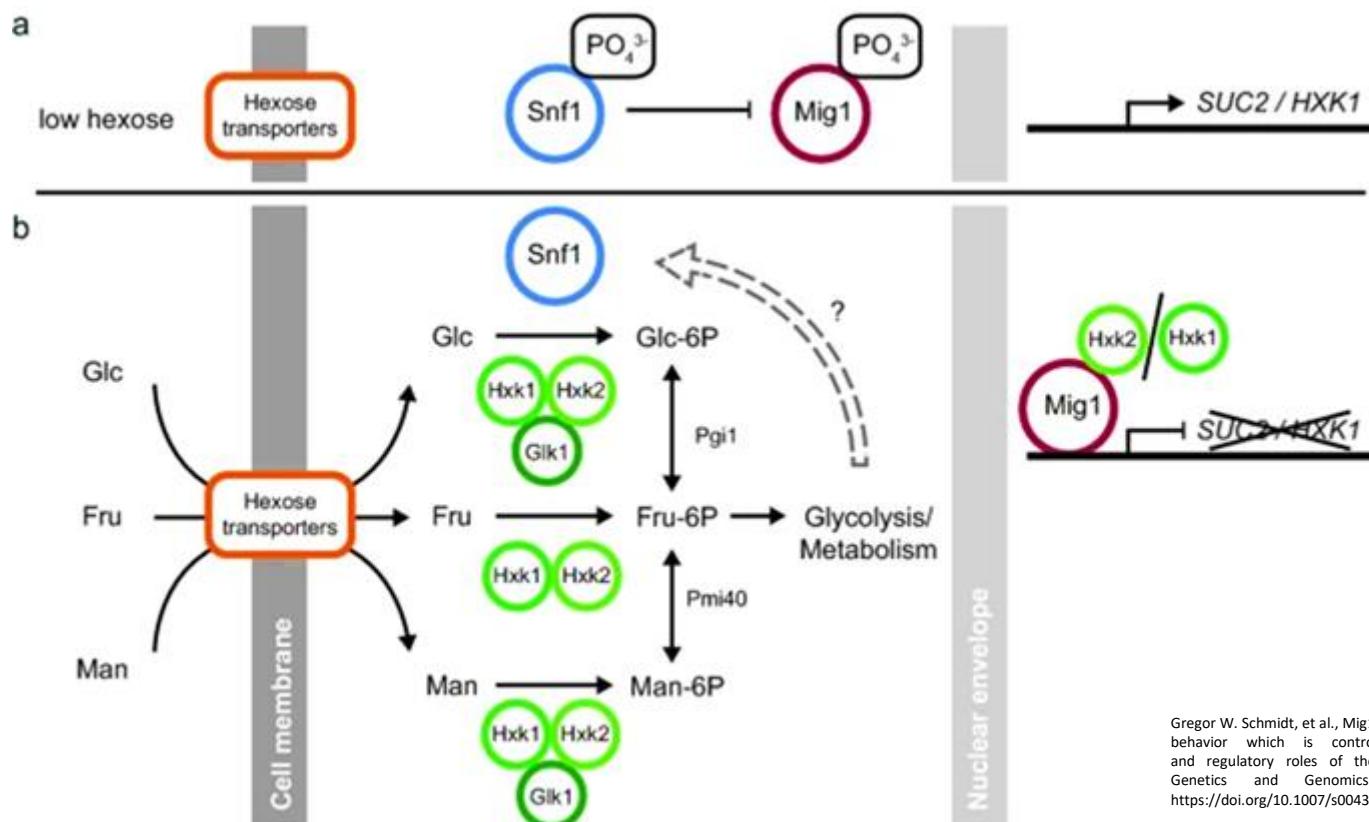
### Alta concentrazione di glucosio:

Il glucosio importato nella cellula attiva l'enzima Hxk2.

L'enzima Hxk2, insieme al fattore di trascrizione Mig1, forma un complesso repressore (Mig1–Hxk2) che inibisce l'espressione dei geni promotori coinvolti nell'utilizzo di altre fonti di carbonio, come *SUC2*, *GAL1* e altri.

In queste condizioni, la chinasi Snf1 rimane inattiva (nella sua forma fosforilata), impedendo la fosforilazione e l'esportazione di Mig1 dal nucleo.

**Risultato:** la cellula utilizza esclusivamente il glucosio come fonte di energia, reprimendo le vie metaboliche alternative.



Gregor W. Schmidt, et al., Mig1 localization exhibits biphasic behavior which is controlled by both metabolic and regulatory roles of the sugar kinases. Molecular Genetics and Genomics (2020) 295:1489–1500  
<https://doi.org/10.1007/s00438-020-01715-4>

### a) Assenza di zuccheri:

la **chinasi Snf1** è attiva e fosforila **Mig1**, provocandone la localizzazione nel citoplasma. Questo consente l'attivazione dei geni regolati da promotori come *SUC2* e *HXK1*, coinvolti nel metabolismo di fonti di carbonio alternative.

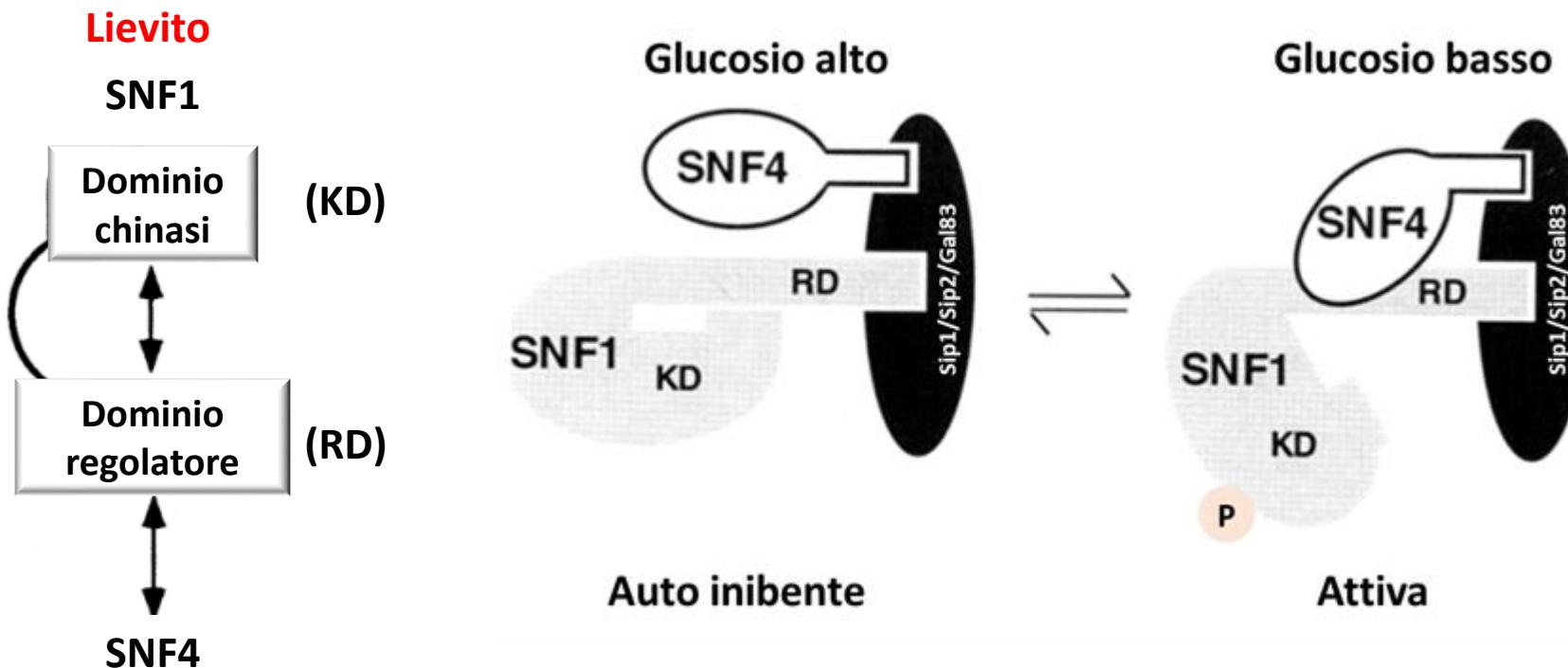
### b) Presenza di zuccheri:

Quando gli esosi sono disponibili, vengono importati nella cellula e fosforilati dagli enzimi **Hxk1**, **Hxk2** e/o **Glk1**. I prodotti fosforilati vengono poi indirizzati nella via glicolitica.

In queste condizioni, la chinasi **Snf1** viene inibita, determinando la defosforilazione di **Mig1**. Mig1, non più fosforilato, trasloca nel nucleo, dove agisce come repressore trascrizionale dei geni *SUC2* e *HXK1*. Inoltre, l'enzima **Hxk2** partecipa direttamente alla repressione di *SUC2* nel nucleo, rafforzando il controllo esercitato da Mig1.

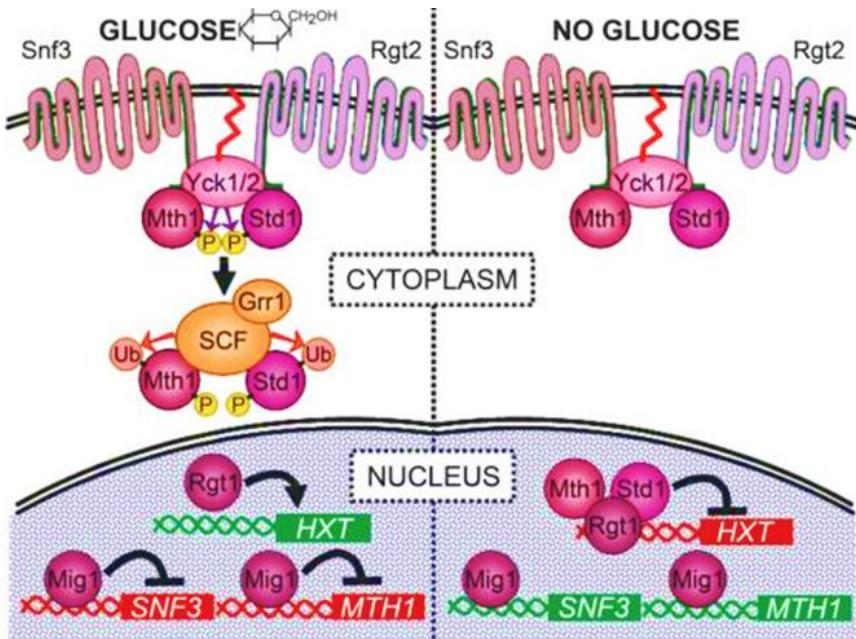
## Modello di regolazione del complesso proteico chinasi SNF1

La proteina SNF1 è associata a formare un complesso con la sua subunità attivante SNF4 e altre proteine (Sip1/Sip2/Gal83).



**Glucosio alto:** il dominio chinasi (KD) della proteina Snf1 si lega al suo dominio regolatore (RD). Questa interazione provoca una **autoinibizione dell'attività chinasica** di Snf1, impedendole di fosforilare i suoi bersagli a valle.

**Glucosio basso:** la subunità Snf4 si lega alla **regione carbossiterminale del dominio regolatore (RD)** di Snf1. Questo legame **libera il dominio chinasi (KD)**, attivando l'attività **chinasica** della proteina e permettendo la fosforilazione dei suoi bersagli a valle.



### In assenza di glucosio:

In assenza di glucosio, i due sensori di membrana **Snf3** e **Rgt2** rimangono **inattivi**.

**Le proteine regolatrici Mth1 e Std1** restano stabili e si associano al repressore **Rgt1** nel nucleo. Il complesso **Rgt1–Mth1/Std1** si lega ai **promotori dei geni HXT**, inibendone la trascrizione.

**Risultato: i geni trasportatori di glucosio (HXT)** non vengono espressi, poiché la cellula non necessita di importare glucosio in condizioni di assenza di zuccheri disponibili.

**b) La via di regolazione **Snf3/Rgt2–Rgt1**** nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* controlla l'espressione dei geni trasportatori di glucosio (**HXT**)

### In presenza di glucosio

I sensori di membrana **Snf3** (ad alta affinità) e **Rgt2** (a bassa affinità) rilevano la presenza di **glucosio extracellulare**.

La loro attivazione innesta una cascata di segnalazione che coinvolge il complesso proteico **SCF/Grr1**, un'ubiquitina-ligasi che indirizza le proteine al proteasoma per la degradazione.

In seguito a questa attivazione, le proteine regolatrici **Mth1** e **Std1** vengono fosforilate e degradate. In assenza di Mth1 e Std1, il fattore di trascrizione **Rgt1** non è più in grado di reprimere i geni **HXT**.

**La fosforilazione di Rgt1** da parte della **PKA (protein chinasi A)** riduce la sua affinità per il DNA, causando la dissociazione dai promotori dei geni HXT. Di conseguenza, questi geni vengono trascritti e si sintetizzano le proteine trasportatrici del glucosio (HXT).

**Risultato finale:** la cellula aumenta la propria capacità di importare glucosio in risposta alla disponibilità esterna.

# Funzione generale delle proteine Snf3 e Rgt2

Entrambe sono proteine di membrana appartenenti alla famiglia dei trasportatori di glucosio (Hxt) ma, a differenza degli Hxt “veri trasportatori”, non trasportano glucosio. Servono come sensori che rilevano la concentrazione di glucosio extracellulare e avviano la cascata di segnalazione che regola trascrizione dei geni HXT.

## Snf3 — Sensore ad alta affinità

Funziona quando il glucosio è scarso (<0,5%).

L'attivazione della **via Snf3** provoca la degradazione di **Mth1**, con conseguente derepressione del gene **HXT**. Questo induce la sintesi dei trasportatori **HXT** ad alta affinità (come *HXT2*, *HXT6* e *HXT7*), che permettono alla cellula di assorbire il glucosio in modo efficiente anche quando la sua concentrazione è bassa.

## Rgt2 — Sensore a bassa affinità

Funziona quando il glucosio è abbondante (>2%).

L'attivazione della **via Rgt2** induce la degradazione del complesso proteico **Std1**, determinando la derepressione del gene **HXT**. Questo processo stimola la **sintesi dei trasportatori HXT** a bassa affinità (come *HXT1* e *HXT3*), che sono ottimizzati per l'importazione di glucosio quando è presente in eccesso.

In questo modo il lievito *S. cerevisiae* adatta dinamicamente l'espressione dei trasportatori HXT alla disponibilità di glucosio, passando da trasportatori ad alta affinità (quando il glucosio è poco) a trasportatori a bassa affinità (quando è tanto).

c) Gpr1 è una proteina di membrana di tipo **GPCR** (G-protein-coupled receptor), cioè un **recettore accoppiato a proteina G**. Quando la **concentrazione di glucosio extracellulare aumenta**, Gpr1 lo riconosce come **ligando** e subisce un **cambio conformativo**. Questo attiva la **proteina G associata**, che a sua volta stimola l'**enzima adenilato ciclasi**, responsabile della conversione di **ATP in AMP ciclico (cAMP)**. Il **cAMP** funge da **segnale di abbondanza di nutrienti**, regolando vie metaboliche e processi cellulari dipendenti dal glucosio.

**Stimola la crescita e la proliferazione** in risposta al glucosio.

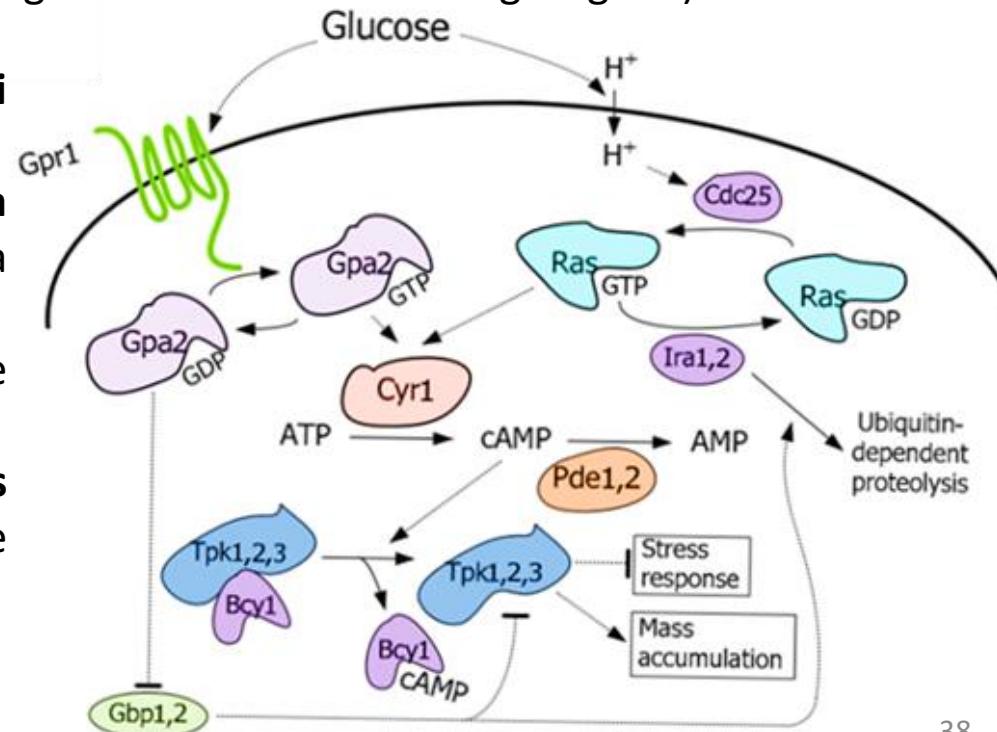
**Attiva la glicolisi** e altre vie metaboliche energetiche.

**Promuove la trascrizione di geni** per la biosintesi e la divisione cellulare.

**Induce la mobilizzazione delle riserve** (es. degradazione di trealosio e glicogeno).

**Effetti inibitori del segnale di abbondanza di nutrienti (es. via cAMP/PKA):**

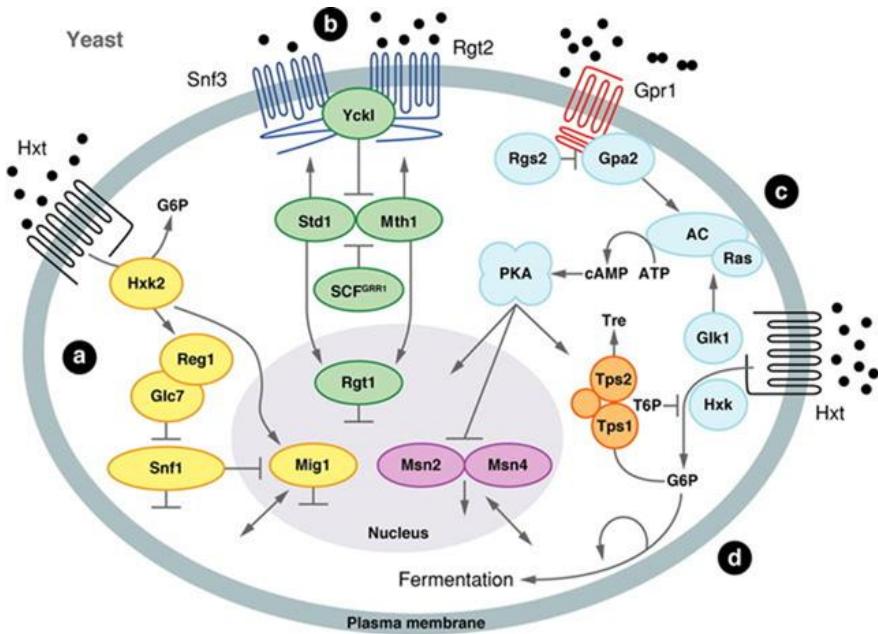
- **Inibizione dell'autofagia e della quiescenza**, poiché il segnale indica condizioni nutrienti favorevoli.
- **Soppressione della via Snf1**, normalmente attiva in condizioni di carenza di glucosio.
- **Riduzione della resistenza allo stress** (termico, ossidativo), tipica delle cellule sottoposte a carenza di nutrienti.



## Il trealosio-6-fosfato (T6P) regola l'attività di Hxk2

Questa via forma parte della regolazione del bilancio del carbonio perché serve a evitare un flusso glicolitico eccessivo quando il glucosio è abbondante.

Il trealosio è uno zucchero è formato da due molecole di glucosio ed è sintetizzato a partire:

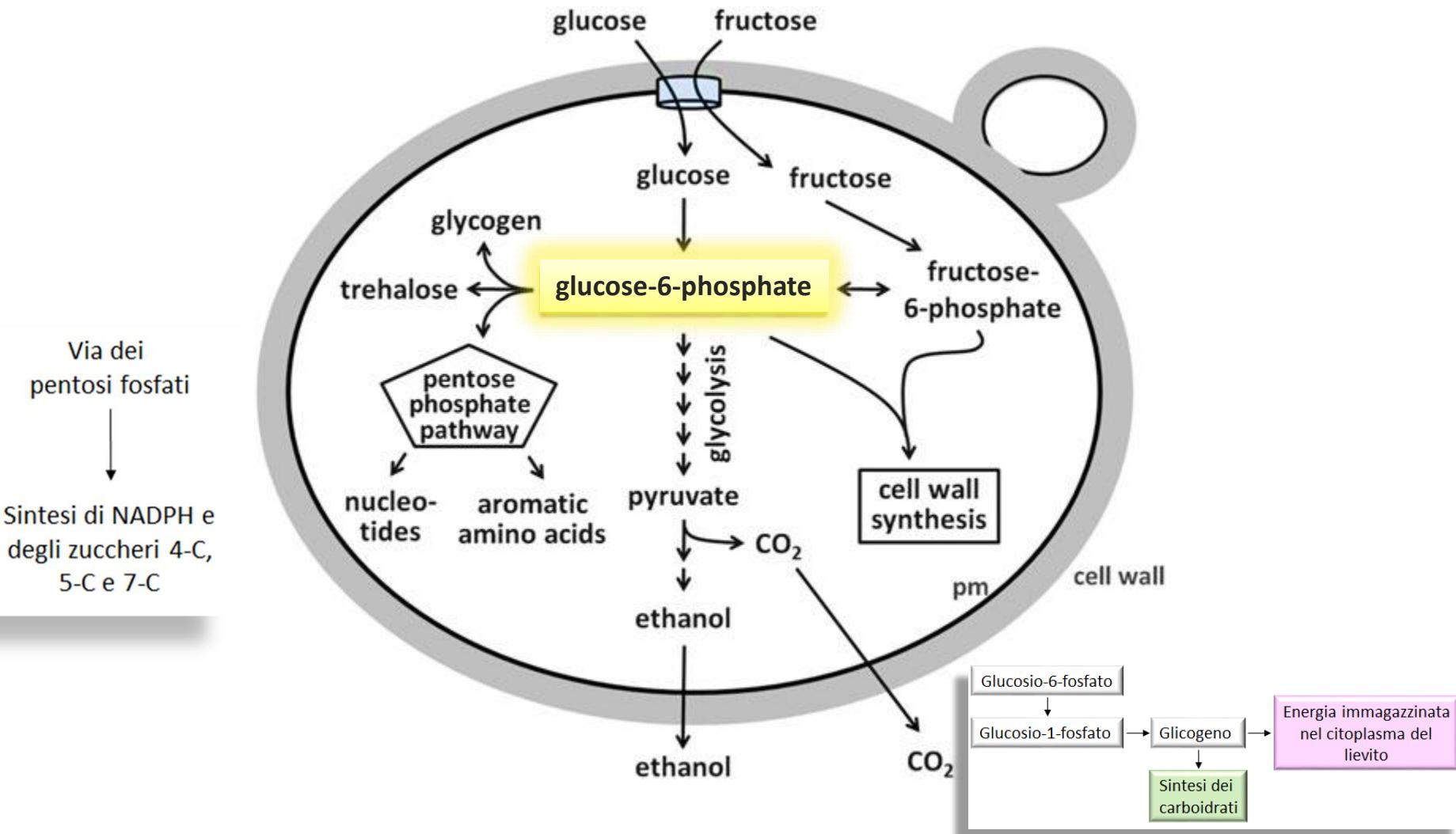


Quando il glucosio entra nella cellula, viene rapidamente fosforilato da Hxk2 (e in parte da Hxk1) a glucosio-6-fosfato (G6P). Se la glicolisi procede troppo velocemente, può verificarsi un accumulo di G6P e una riduzione della disponibilità di ATP.

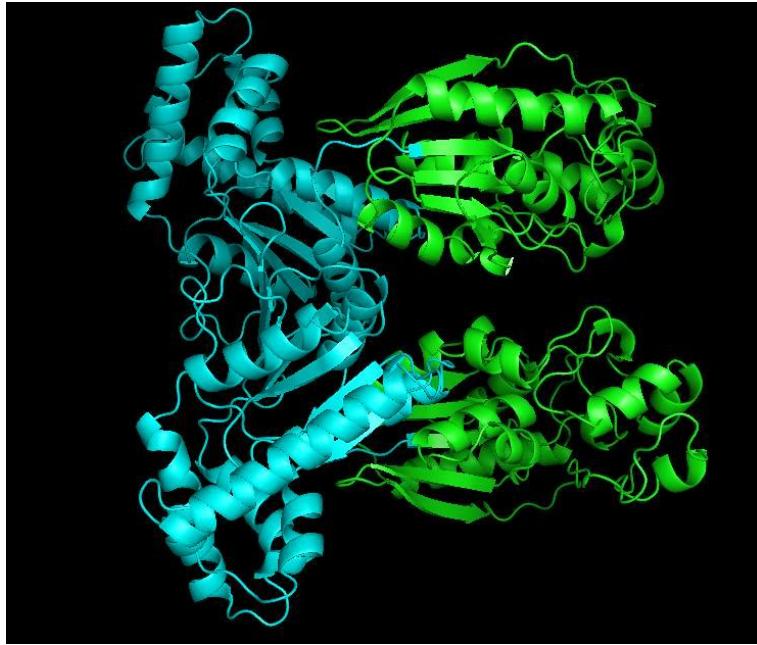
Il trealosio-6-fosfato (T6P), prodotto a partire dal G6P tramite l'enzima Tps1, inibisce allostericamente Hxk2, impedendo così un'eccessiva fosforilazione del glucosio e contribuendo a regolare il flusso glicolitico.

Questo crea un meccanismo a **feedback negativo**: quando il glucosio entra nella cellula, viene fosforilato a G6P e parte di esso viene convertito in trealosio-6-fosfato (T6P). L'aumento di T6P inibisce Hxk2, riducendo la fosforilazione del glucosio. In questo modo, si ristabilisce l'equilibrio del flusso glicolitico e si evita un consumo eccessivo di ATP.

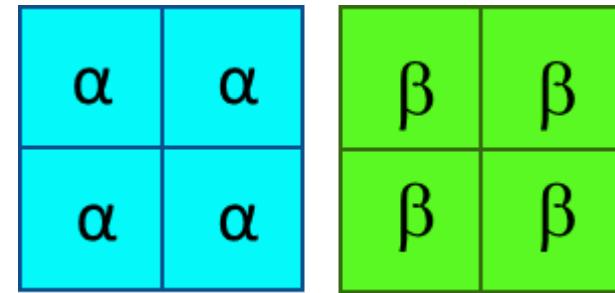
## Il Glucosio-6-P è un punto di ramificazione di diverse vie metaboliche



Il glucosio 6-P è comune a molte vie metaboliche e rappresenta un punto di ramificazione del metabolismo del glucosio



La fosfofruttochinasi 1 (PFK1) catalizza la fosforilazione del fruttosio-6-fosfato a fruttosio-1,6-bisfosfato ed è la prima reazione irreversibile della glicolisi.



In *S. cerevisiae*, l'enzima ottamerico è costituito da 4 subunità  $\alpha$  e 4 subunità  $\beta$ .

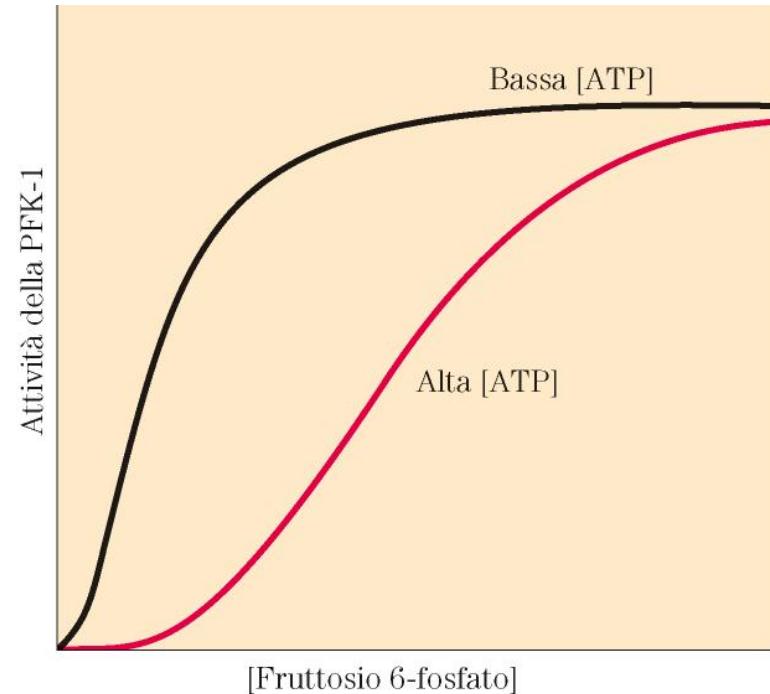
l'ATP è il più potente inibitore dell'enzima mentre, l'AMP e soprattutto il fruttosio-2,6-bisfosfato agiscono come attivatori.

La disponibilità di azoto (ammonio) nei mosti durante la fermentazione stimola l'attività della fosfofruttochinasi nel lievito.

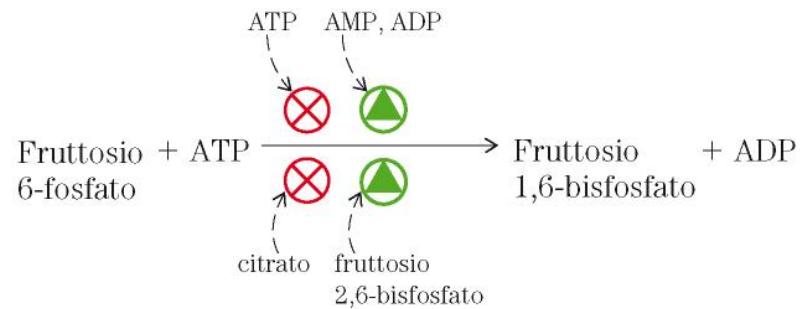
# La fosfofruttochinasi-1 e la sua regolazione



(a)

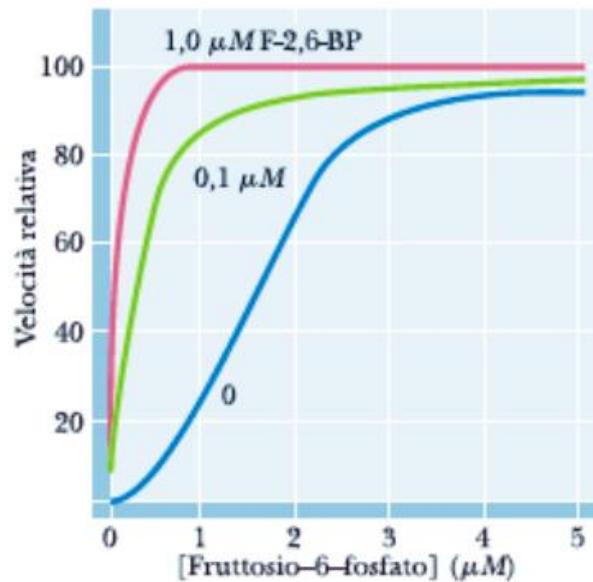


(b)



(c)

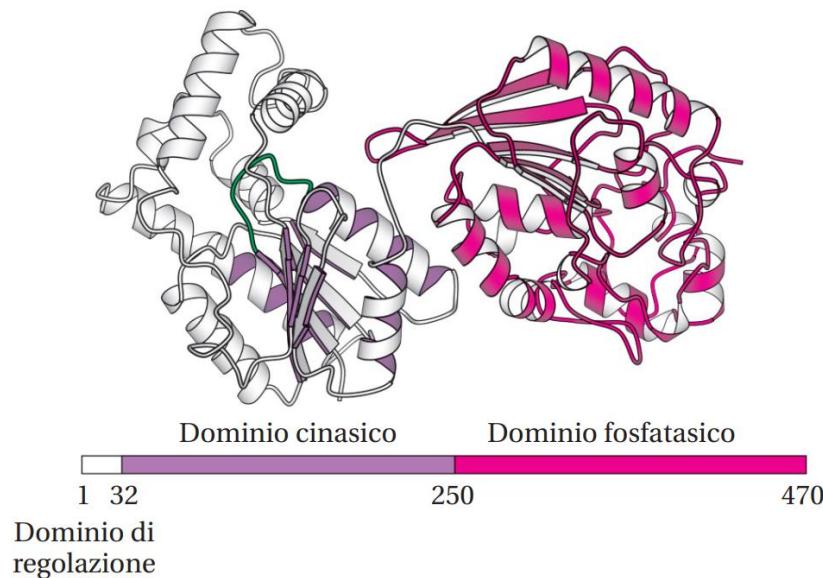
## Controllo della fosfofruttochinasi 1



**FIGURA 18.10** Il fruttosio-2,6-bisfosfato attiva la fosfofruttochinasi, aumentando l'affinità dell'enzima per il fruttosio-6-fosfato e ristabilendo la dipendenza iperbolica dell'attività enzimatica dalla concentrazione del substrato.

Il fruttosio 2,6 bisfosfato attiva la fosfofruttochinasi 1 diminuendo gli effetti inibitori dell'ATP.

Questo è un attivatore allosterico che sposta l'equilibrio conformazionale dell'enzima tetraedrico dallo stato T allo stato R.



## Struttura dell'enzima tandem

Il fruttosio 2,6 bisfosfato si forma dalla fosforilazione del fruttosio 6 fosfato, una reazione catalizzata dalla fosfofruttochinasi 2, mentre viene defosforilato dalla fruttosio 2,6-bisfosfatasi, entrambi presenti in unica catena polipeptidica chiamato enzima a tandem

La fase finale della glicolisi, mediata dalla piruvato chinasi, genera il secondo ATP ed è essenzialmente irreversibile. L'enzima funge da secondo punto di controllo della glicolisi ed è anche regolato allostericamente.

### Effettori positivi

**Fruttosio-1,6-bisfosfato (F1,6BP):** È un prodotto intermedio della glicolisi.

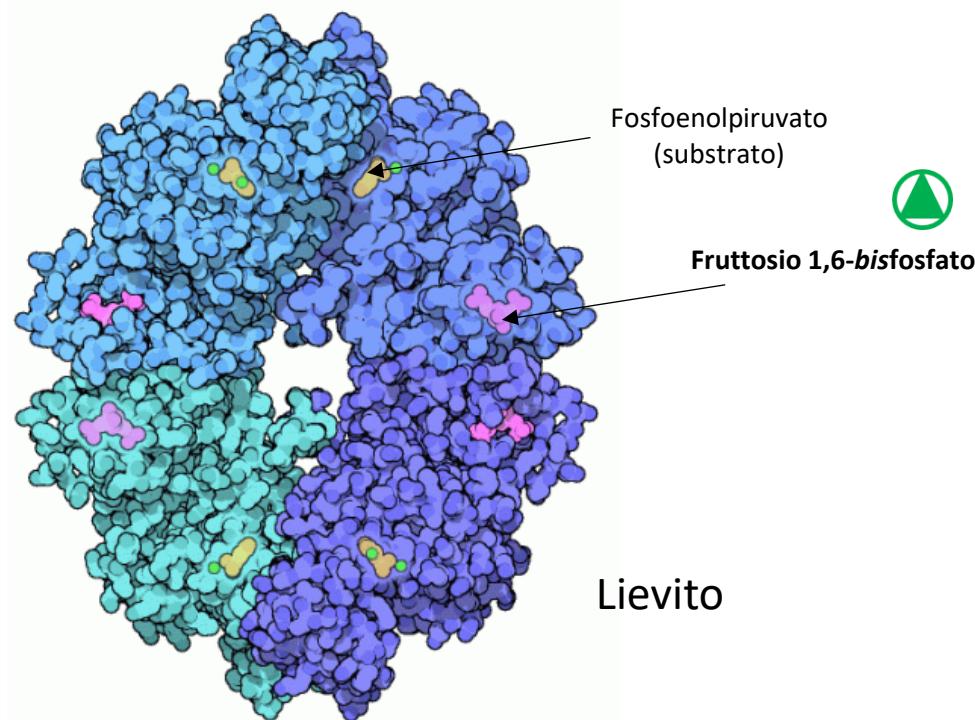
Funziona come **attivatore allosterico** della piruvato chinasi, più glicolisi aumenta l'attività della piruvato chinasi.

### Effettori negativi

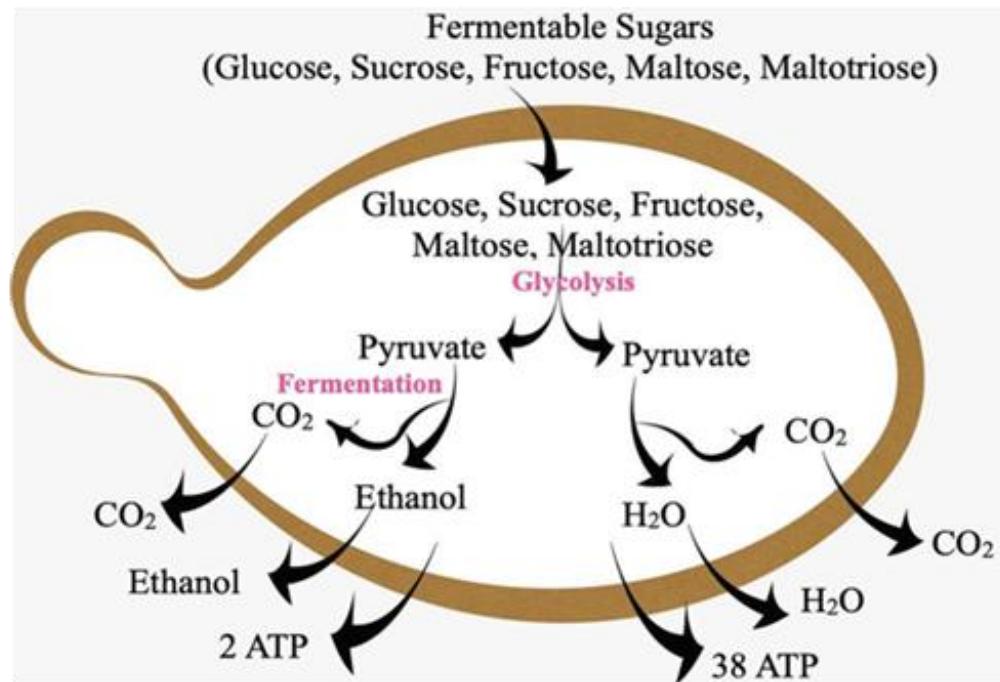
**ATP:** È un segnale di alta energia che inibisce la piruvato chinasi.

**L'Acetil-CoA:** È un segnale che indica sufficiente zucchero per la respirazione che inibisce la piruvato chinasi.

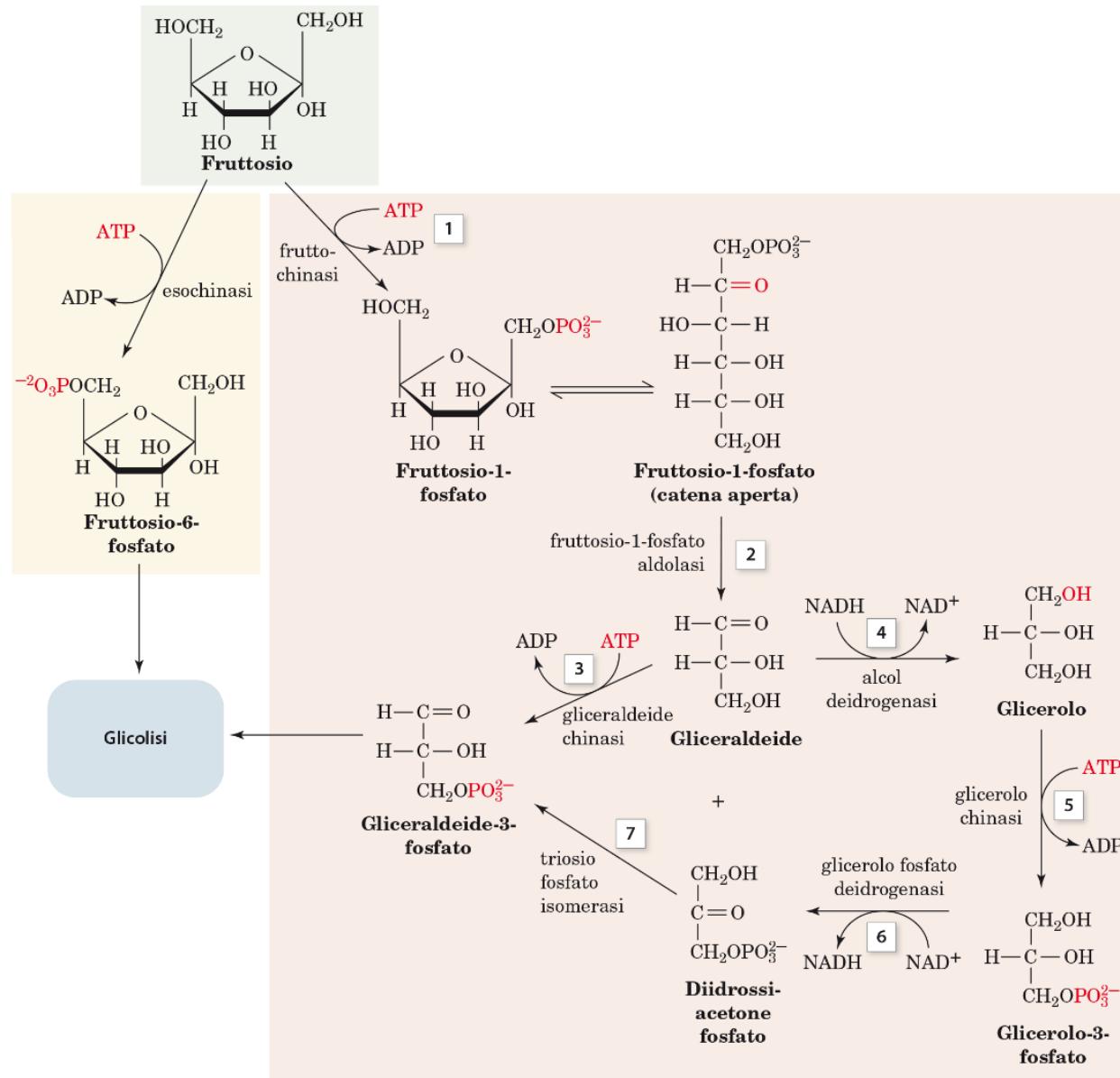
**Alanina:** È un aminoacido segnale che indica alta sintesi proteica e abbondanza di amminoacidi che inibisce.



# Uso di altri substrati nella glicolisi



# Fruttosio



fruttosio



fruttosio 1-fosfato

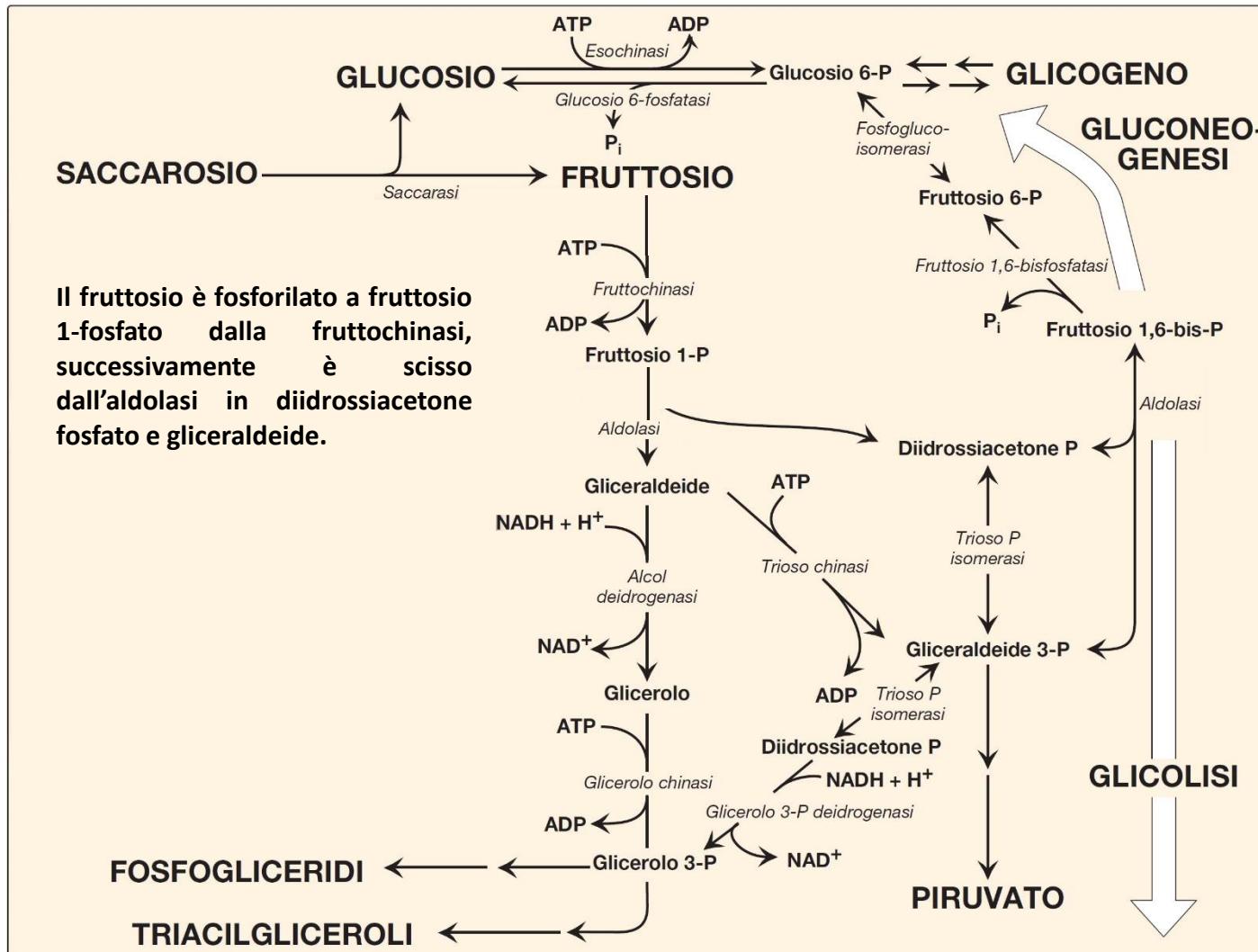


gliceraldeide + diidrossiacetone fosfato



gliceraldeide 3-fosfato

# Metabolismo del fruttosio



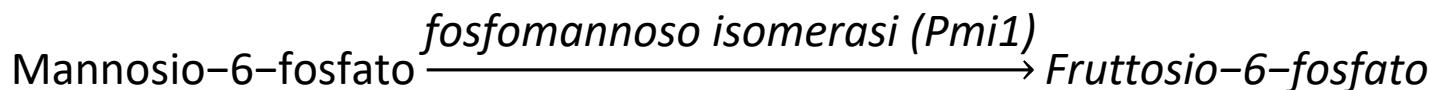
## Il mannosio nella glicolisi

Il mannosio entra dall'esterno tramite i trasportatori Hxt, questi trasportatori non sono completamente specifici perché riconoscono diversi esosi oltre al glucosio e fruttosio anche il mannosio e galattosio in parte. Il Hxt1, Hxt2, Hxt3 e Hxt4 possono importare mannosio efficacemente.

Una volta entrato nel citoplasma, il mannosio è fosforilato da una esochinasi (Hxk1 o Hxk2) secondo la reazione:

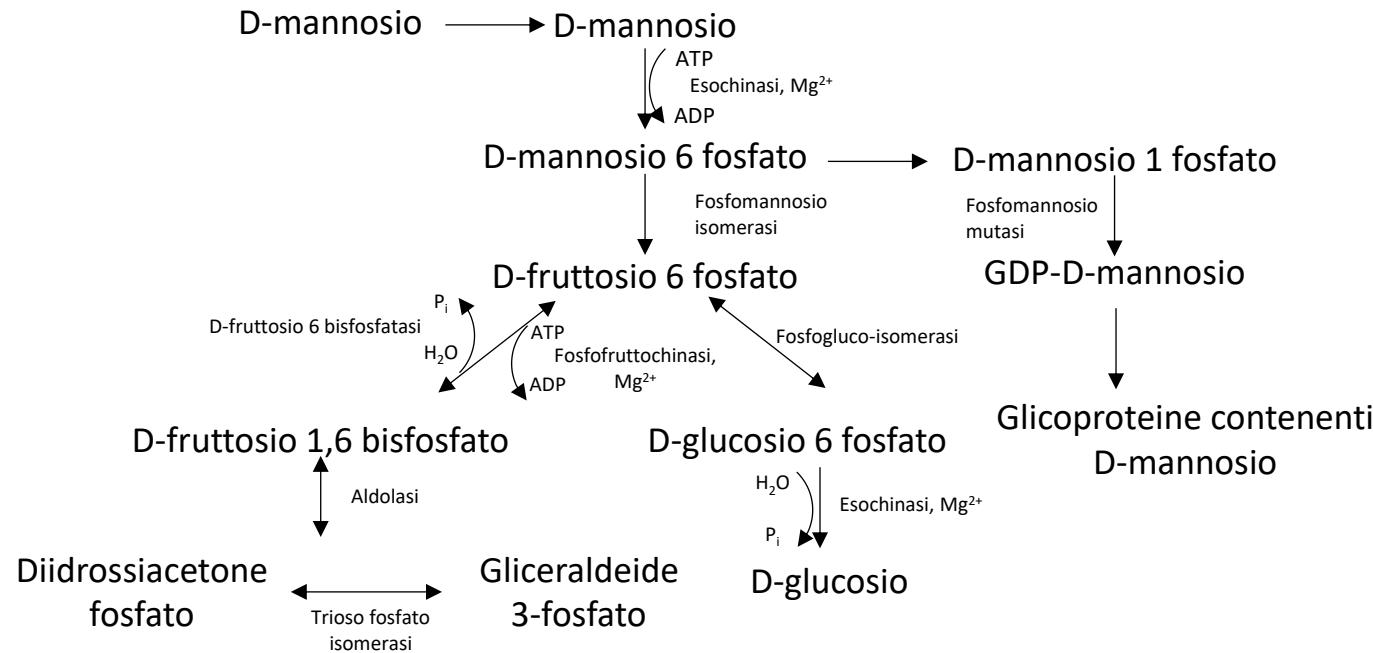


Il mannosio-6-fosfato viene isomerizzato a fruttosio-6-fosfato (Fru-6-P) da un enzima chiave:



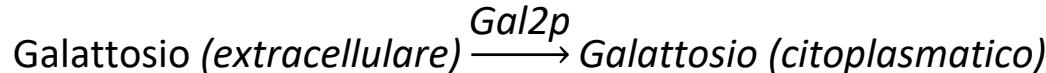
Una volta che è stato convertito in fruttosio-6-fosfato, il mannosio segue esattamente la stessa via del glucosio

# Il mannosio nella glicolisi



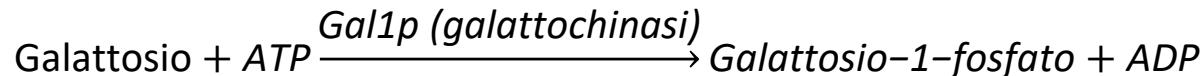
## Il galattosio nella glicolisi

Il galattosio entra nella cellula principalmente attraverso i trasportatori Hxt e soprattutto attraverso il trasportatore specifico **Gal2p** (codificato dal gene GAL2).



Una volta entrato nella cellula, il galattosio viene trasformato in glucosio-1-fosfato (G1P) e poi in glucosio-6-fosfato (G6P) grazie a quattro enzimi principali:

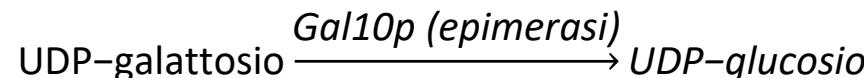
### 1) Fosforilazione



### 2) Scambio con UDP-glucosio



### 3) Epimerizzazione



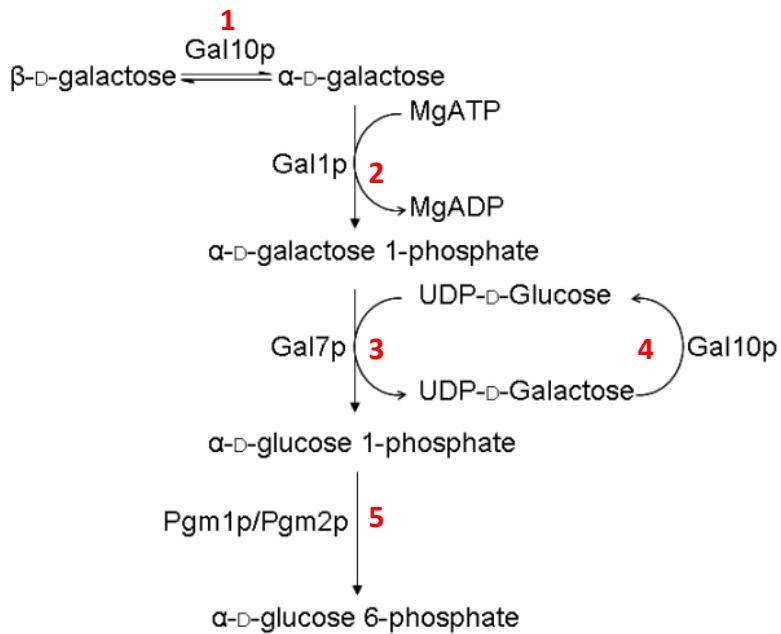
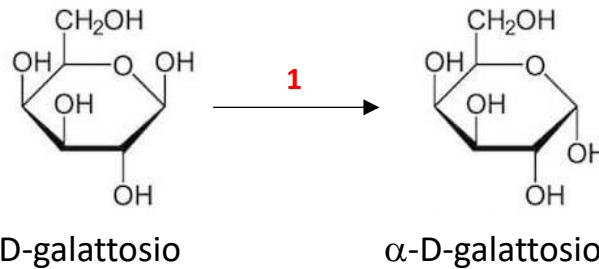
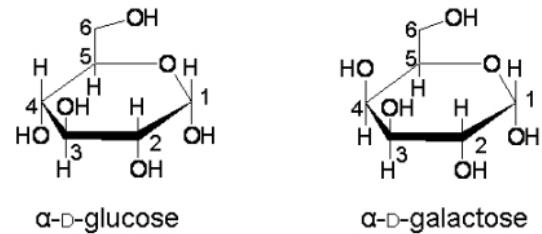
L'UDP-galattosio viene rigenerato in **UDP-glucosio**, che torna alla reazione precedente, questo mantiene attivo il ciclo.

### 4) Isomerizzazione finale



Nota: L'espressione del gene GAL2 è indotta solo quando il galattosio è presente e il glucosio è assente, perché il glucosio reprime la via GAL tramite il repressore Mig1.

Nel *Saccharomyces* il galattosio entra nella glicolisi attraverso la via di Leloir, un percorso specifico che converte il galattosio in glucosio-6-fosfato da 5 enzimi

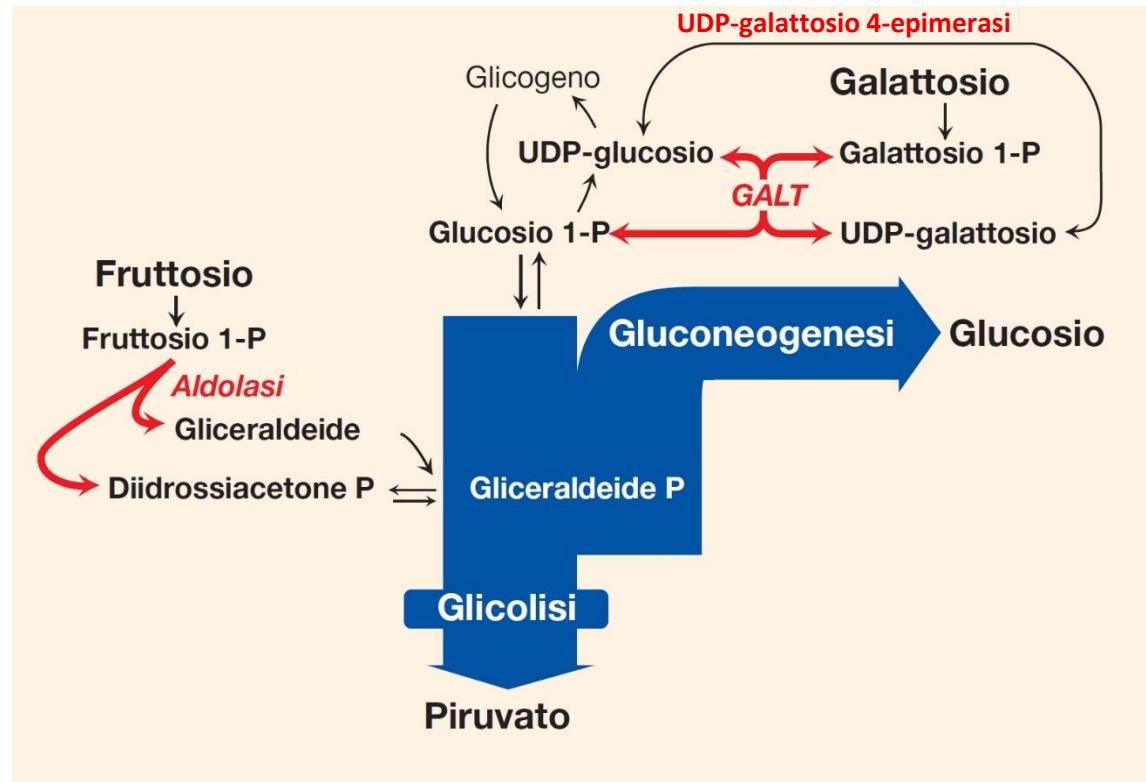


- 1) Galattosio mutarotasi: conversione di  $\beta$ -D-galattosio in  $\alpha$ -D-galattosio
- 2) Galattochinasi: forma il galattosio 1-fosfato (fosforila l'  $\alpha$ -D-galattosio)
- 3) Galattosio 1-fosfato uridiltransferasi: trasforma il galattosio 1-fosfato in UDP-galattosio
- 4) UDP-galattosio 4-epimerasi: trasforma UDP-galattosio in UDP-glucosio
- 5) Fosfoglucomutasi: converte il glucosio 1-fosfato in glucosio 6-fosfato

La fonte principale di fruttosio è il saccarosio che, in seguito alla scissione enzimatica, libera fruttosio e glucosio in quantità equimolari. Inizialmente il fruttosio è fosforilato dalla fruttochinasi, successivamente è scisso dall'aldolasi in diidrossiacetone fosfato e gliceraldeide.

La principale fonte di galattosio è il lattosio. Il galattosio è inizialmente fosforilato a galattosio 1-fosfato dalla galattochinasi. Il galattosio 1-fosfato è trasformato in UDP galattosio dalla GALT (galattosio 1-fosfato uridiltrasferasi), che utilizza UDP-glucosio come fonte nucleotidica. Per entrare nel flusso principale del metabolismo del glucosio, l'UDP-galattosio deve prima essere isomerizzato a UDP-glucosio dalla UDP-galattosio 4-epimerasi.

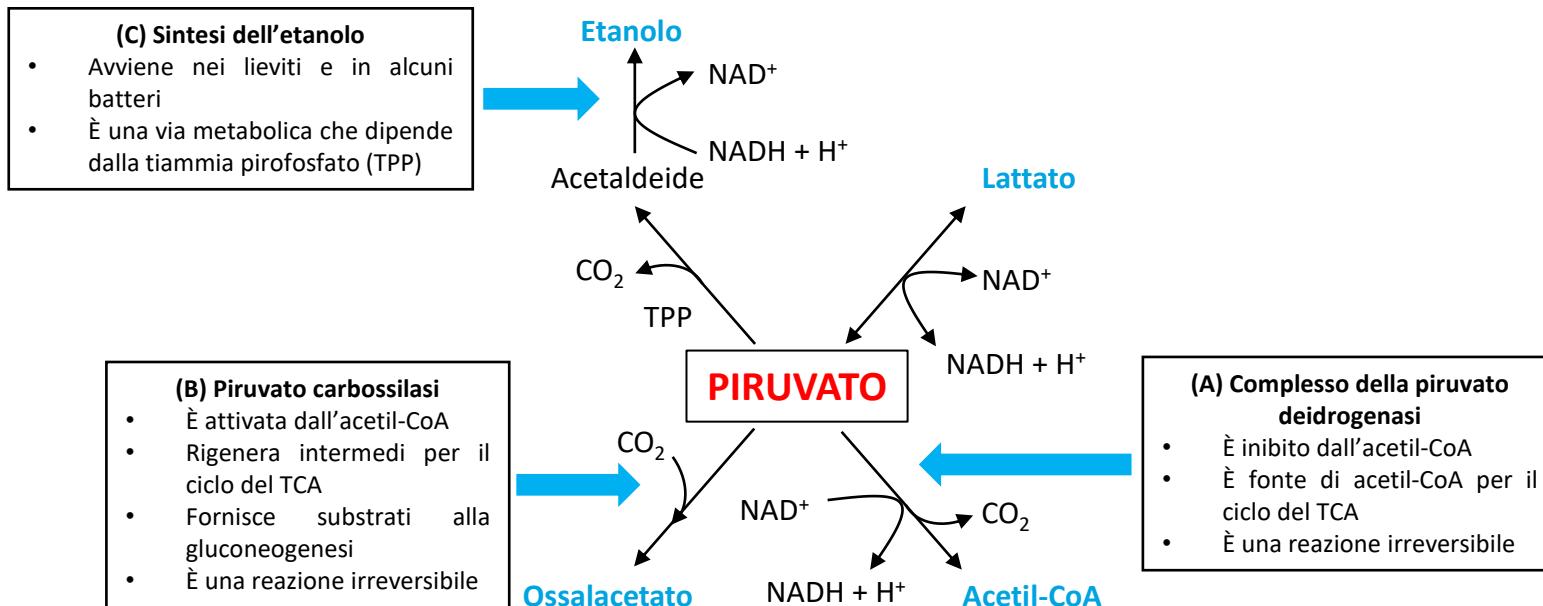
# Metabolismo del fruttosio e galattosio



## fonti di carbonio alternative per la fermentazione alcolica in *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte di carbonio	Enzimi principali	Intermedio comune nella via della glicolisi	Regolazione
<b>Glucosio</b>	$\text{Hxk2} \rightarrow \text{G6P}$	Glucosio-6-fosfato	Fonte preferita; reprime le altre vie (catabolite repression)
<b>Fruttosio</b>	$\text{Hxk2} \rightarrow \text{F6P}$	Fruttosio-6-fosfato	Entra quasi direttamente nella glicolisi
<b>Mannosio</b>	$\text{Hxk2} \rightarrow \text{Man-6-P} \rightarrow (\text{Pmi1}) \rightarrow \text{F6P}$	Fruttosio-6-fosfato	Usa stessa esochinasi del glucosio
<b>Galattosio</b>	Via di Leloir (Gal1–Gal7–Gal10–Pgm2)	Glucosio-6-fosfato	Attiva solo in assenza di glucosio
<b>Maltosio</b>	$\alpha\text{-glucosidasi (Mal62p)} \rightarrow 2 \text{ Glucosio}$	Glucosio-6-fosfato	Indotto da maltosio, represso da glucosio
<b>Saccarosio</b>	Invertasi (Suc2p) $\rightarrow$ Glucosio + Fruttosio	G6P/F6P	Entrano nella glicolisi
<b>Trealosio</b>	Trehalasi (Nth1p) $\rightarrow$ 2 Glucosio	G6P	Degradato in risposta alla protein chinasi A (PKA) attiva
<b>Glicerolo</b>	Glycerol kinasi (Gut1) $\rightarrow$ G3P $\rightarrow$ DHAP	Diidrossiacetone-P	Richiede respirazione, non fermentazione pura

# Destini metabolici alternativi del piruvato



- La decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil-CoA: avviene ad opera del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHC). Questo enzima trasforma irreversibilmente il piruvato in acetil-CoA, substrato del ciclo dell'acido citrico e fonte di carbonio per la sintesi degli acidi grassi (Respirazione).
- La carbossilazione del piruvato a ossalacetato: da parte della piruvato carbossilasi che catalizza una reazione irreversibile. Tale reazione genera un intermedio del ciclo dell'acido citrico e fornisce il substrato per la gluconeogenesi (Sintesi di glucosio da intermedi glucidici non glucidici).
- La riduzione del piruvato a etanolo: avviene mediante la decarbossilazione da parte dell'enzima piruvato decarbossilasi. Il NADH deve essere riciclato a NAD<sup>+</sup> per evitare che limiti l'attività glicolitica (Fermentazione).